

Dissertação | Trabalho de Projeto – Relatório de Execução

Mestrado Integrado em Medicina

2012/2013

IMUNOSSUPRESSORES NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL:

**Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e
contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da
doença.**

Rita Ribeiro Dias

Orientador (a):

Doutora Paula Lago

Porto, 2013

IMUNOSSUPRESSORES NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL:

Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

Aluno (a): Rita Ribeiro Dias

Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de
Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

E-mail: rita.ribeiro.d@gmail.com; Telemóvel: 911542805

Orientador: Doutora Paula Maria Lago Vieira Santos

Médica, especialista em Gastreenterologia, assistente hospitalar
graduada

Centro Hospitalar do Porto / Hospital Geral de Santo António.

E-mail: paulalago@netcabo.pt; Telemóvel: 962860392.

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Rua de Jorge Viterbo Ferreira, n.º228, 4050-313 PORTO

Telefone: 220 428 000

PREÂMBULO

Este trabalho, apresentado para fins de obtenção do grau de Mestre em Medicina, integra um projeto desenvolvido no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP) e do Centro Hospitalar do Porto (CHP) e está estruturado em duas partes: proposta de projeto de investigação e respetivo relatório de execução

A proposta de projeto foi elaborada durante o ano letivo 2011/2012 e o projeto foi executado durante o ano letivo 2012/2013.

O projeto foi executado no Serviço de Gastrenterologia e de Hematologia Clínica, nomeadamente no Laboratório de Citometria do Centro Hospitalar do Porto sob orientação da Doutora Paula Lago, médica especialista em Gastrenterologia, e sob supervisão da Professora Doutora Margarida Lima, responsável pela DIIC.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Paula Lago, pela disponibilidade para me orientar neste trabalho, pelo apoio e tempo que dedicou, pelos esclarecimentos e por toda a motivação e confiança que me transmitiu

À Professora Doutora Margarida Lima, por ter criado as condições para a conceção deste trabalho, pela dedicação e pela incansável paciência, por toda a ajuda em todos os momentos, e por me ter feito gostar ainda mais da investigação.

Ao Dr. João Rodrigues, Técnico Superior de Saúde, pela ajuda no laboratório de citometria.

À minha família e amigos, por me terem compreendido e apoiado nos dias menos bons, e por contribuírem tanto para que seja quem sou e tenha chegado onde cheguei. Em especial à Vânia, por me fazer ver as dificuldades como um desafio, por acreditar e me fazer acreditar, por tudo e porque sem ela eu também não teria conseguido.

RESUMO

Introdução

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) está ainda envolta em muitas interrogações, quer no que respeita à fisiopatologia, quer em relação ao tratamento. A fisiopatologia desta doença, parece envolver múltiplos fatores genéticos e ambientais que condicionam um desequilíbrio imunológico determinante para a génese da doença; a este respeito, existem algumas evidências de que os monócitos CD14⁺CD16⁺, devido à sua maior capacidade de apresentação antigénica e ao seu perfil de secreção de citocinas, tenham um papel na perpetuação da inflamação. No que respeita ao tratamento, os imunossuppressores têm evoluído como uma importante arma terapêutica, sendo importante um adequado conhecimento da sua aplicabilidade e limitações.

Objetivos

Este estudo teve como principais objetivos caracterizar a utilização de imunossuppressores nos doentes com DII no Centro Hospitalar do Porto (CHP), e estudar a sua influência sobre a subpopulação de monócitos circulantes CD14⁺CD16⁺.

Material e Métodos

O projeto de investigação proposto é de natureza observacional e teve duas componentes: uma, de carácter transversal, que consistiu na caracterização da utilização de fármacos imunossuppressores nos doentes seguidos na consulta de Doença Inflamatória Intestinal do CHP, através da consulta dos respetivos processos clínicos; e outra, longitudinal e prospetiva, que visou o estudo laboratorial de um grupo de doentes com indicações clínicas para terapêutica com imunossuppressores, em que se pretendeu avaliar os níveis de monócitos CD14⁺ CD16⁺ em amostras de sangue, antes e três meses após o início do tratamento.

Resultados

Dos 914 doentes com DII, 385 (42.1%) necessitaram de tratamento com um 1º imunossupressor e 40 (10.4%) tiveram necessidade de tratamentos com um 2º imunossupressor. Em ambas as situações, os imunossuppressores foram utilizados com mais frequência na Doença de Crohn (DC). O fármaco mais utilizado como primeiro imunossupressor foi uma tiopurina em 97,7% dos pacientes, enquanto o metotrexato (MTX) foi o mais utilizado como segundo imunossupressor em 97.5% dos pacientes. As reações adversas ocorreram sobretudo com o primeiro imunossupressor em 43.7% destes doentes e foram o principal motivo de suspensão ou substituição do fármaco.

Os doentes com DII medicados com corticosteróides apresentavam uma depleção dos monócitos CD14⁺CD16⁺ no sangue periférico. Os indivíduos com DII, sem corticoterapia, tiveram uma diminuição estatisticamente significativa da percentagem

($p=0.008$) e do número absoluto ($p=0.004$) de monócitos CD14+CD16+ circulantes, durante o tratamento com azatioprina (AZA).

Conclusão: Os imunossupressores convencionais, particularmente a tiopurina, continuam a ser uma importante estratégia terapêutica na DII. Os pacientes sob tratamento com estes fármacos devem ser avaliados regularmente, uma vez que eles acarretam um número considerável de reações adversas.

A AZA parece influenciar a percentagem de monócitos CD14+CD16+ no sangue periférico de pacientes com DII, mas estudos randomizados e de maiores dimensões serão essenciais para melhor caracterizar o seu papel sobre estas populações.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal, Colite ulcerosa, Doença de Crohn, Imunossupressores, Azatioprina, Metotrexato, Monócitos CD14⁺CD16⁺.

ABSTRACT

Background

There are still several uncertainties regarding Inflammatory Bowel Disease (IBD), either concerning its physiopathology or its treatment. The physiopathology of this condition seems to involve multiple genetic and environmental factors, conditioning an immunologic unbalance, which is paramount to IBD development. Respecting this matter, there is some evidence that CD14⁺CD16⁺ monocytes have a significant role perpetuating inflammation, due to their higher ability of antigenic presentation and to their cytokine secretion. Immunosuppressive drugs have evolved as an important therapeutic weapon in IBD, which justifies a further acknowledgement of their applicability and limitations.

Objectives

We aim to characterize use immunosuppressive drugs in patients with IBD from a central hospital and to investigate their influence on a subpopulation of circulating CD14⁺CD16⁺ monocytes.

Material and methods

This research project has an observational nature and it is divided in two components. It was used a cross-sectional approach in order to characterize use of immunosuppressive drugs in patients followed in IBD consultation at Centro Hospitalar do Porto. Data was collected by reviewing their medical history files. The other component of this study had a prospective longitudinal approach, aiming to assess CD14⁺CD16⁺ monocytes levels from blood samples, collected before treatment initiation and three months after, in a group of patients who had indication for immunosuppressive therapy.

Results

We evaluated 914 patients with IBD, of which 385 (42.1%) needed treatment with a first immunosuppressive drugs and 40 (10.4%) needed treatment with a second immunosuppressive drugs. In both cases, the immunosuppressive drugs were used mainly in CD. The drug most frequently used as first immunosuppressive drug was a thiopurine in 97.7% of patients, while metothrexate was used as second choice in 97.5% of patients. Adverse reactions occurred especially with the first immunosuppressive drug, in 43.7% of those patients and it was the main reason to stop or replace the treatment.

CD14⁺CD16⁺ monocytes were depleted in patients treated with corticosteroids. Patients with IBD, without corticosteroid treatment, showed a significant decrease both in the percentage ($p=0,008$) and in the absolute count ($p=0,004$) of CD14⁺CD16⁺ monocytes in peripheral blood, during the therapy with azathioprine (AZA).

Conclusions

Traditional immunosuppressive drugs namely thiopurines, are still an important strategy in IBD therapy, but patients under this treatment should be regularly evaluated, because these drugs are associated with a considerable number of adverse reactions. AZA seems to influence CD14⁺CD16⁺ monocytes proportion in peripheral blood among patients with IBD. Despite these findings, the conduction of randomized controlled trials with larger sample size is paramount to further assess the role of AZA in this population.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, Immunossupressor, Azathioprine, Metothrexate, CD14⁺CD16⁺ monocytes

ÍNDICE

PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO	1
PLANO CIENTIFÍCO	2
INTRODUÇÃO	3
ENQUADRAMENTO TEÓRICO / ESTADO DA ARTE	5
<i>Doença inflamatória intestinal.....</i>	<i>5</i>
<i>Etiopatogenia e fisiopatologia da doença inflamatória intestinal.....</i>	<i>8</i>
<i>Tratamento da doença inflamatória intestinal.....</i>	<i>11</i>
FUNDAMENTOS DO ESTUDO	20
Problemas	20
Questões	20
Objetivos do estudo	20
INTERVENIENTES	21
Instituições, Departamentos e Serviços	21
Equipa de Investigação.....	21
METODOLOGIA	24
Critérios de revisão da literatura	24
Desenho do estudo.....	24
PLANO DE TRABALHO	26
Tarefas associadas ao projecto	26
MATERIAL E MÉTODOS	30
Revisão casuística.....	30
Estudo laboratorial.....	30
Análise estatística dos dados.....	30
Equipamento	30
Reagentes e outro material consumível.....	30
CALENDARIZAÇÃO	31
Duração.....	31
Datas de início e conclusão	31
CRONOGRAMA GLOBAL DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	31
Cronograma de execução do projeto	32
INDICADORES DE PRODUÇÃO	33
Comunicações orais e posters.....	33
Trabalhos escritos	33
QUESTÕES ÉTICAS	34
INFORMAÇÃO DOS PARTICIPANTES E CONSENTIMENTO INFORMADO	35
Informação dos participantes.....	35
Consentimento informado.....	35
Outras questões com implicações éticas	35
PLANO FINANCEIRO	36
ORÇAMENTO	37
FINANCIAMENTO.....	37
GLOSSÁRIO.....	38

SIGLAS E ACRÓNIMOS	39
TERMOS TÉCNICOS.....	39
ANEXOS	40
FOLHA DE ROSTO DO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO	42
PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL	44
TERMOS DE RESPONSABILIDADE	45
TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL	46
CONSENTIMENTO INFORMADO	47
<i>Pedido de dispensa de Consentimento Informado.....</i>	<i>47</i>
<i>Termo de consentimento informado.....</i>	<i>48</i>
<i>Folheto informativo para os participantes.....</i>	<i>49</i>
FORMULÁRIO DE RECOLHA DE DADOS.....	50
RELATÓRIO DE EXECUÇÃO DO PROJETO.....	51
METODOLOGIA	52
<i>1ª Fase: Caraterização da utilização de imunossuppressores nos pacientes com DII</i>	<i>52</i>
<i>2ª Fase: Quantificação e Caracterização dos Monócitos por Citometria de Fluxo.....</i>	<i>54</i>
RESULTADOS.....	56
<i>1ª Fase: Caraterização da utilização de imunossuppressores nos pacientes com DII</i>	<i>56</i>
<i>2ª Fase: Quantificação e Caracterização dos Monócitos por Citometria de Fluxo.....</i>	<i>65</i>
DISCUSSÃO.....	76
<i>1ª Fase: Caraterização da utilização de imunossuppressores nos pacientes com DII</i>	<i>76</i>
<i>2ª Fase: Quantificação e Caracterização dos Monócitos por Citometria de Fluxo.....</i>	<i>81</i>
CONCLUSÕES	88
PONTOS FORTES.....	88
PONTOS FRACOS	88
PERSPETIVAS FUTURAS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

PLANO CIENTÍFICO

INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII), que engloba a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerosa (CU), afeta, aproximadamente, uma a duas em cada mil pessoas nos países desenvolvidos, comprometendo a qualidade de vida e condicionando significativa morbilidade. Apesar de não existir ainda cura para nenhuma destas doenças, nos últimos anos, sobretudo nas duas últimas décadas, muitas investigações têm incidido sobre esta área, trazendo assim importantes avanços, quer na compreensão da etiologia e fisiopatologia destas doenças, quer ao nível das possibilidades terapêuticas (1).

Apesar da fisiopatologia da doença não estar ainda completamente esclarecida, à luz dos conhecimentos atuais, a etiologia parece estar relacionada com uma interação multifactorial envolvendo factores genéticos, ambientais e clínicos (2). O sistema imunitário constitui o principal mediador da patogénese da DII e da sua tradução clínica. Por sua vez, as mutações genéticas que desencadeiam respostas imunológicas anómalas perante os factores ambientais (particularmente a flora bacteriana intestinal), são também um importante contributo para o desenvolvimento da doença (2, 3). As mutações ao nível do gene NOD2, que levam a perda de função, aparentam ser a uma alteração genética importante na patogénese da DII, apesar do mecanismo responsável por este aumento de suscetibilidade, estar fracamente compreendido (4). Também os diferentes factores ambientais, podem aumentar a incidência da DII, pelo impacto que têm sobre a resposta imunológica, sendo, conjuntamente com os factores genéticos, afetam sobremaneira a apresentação da DC e da CU.

Os monócitos contribuem para a iniciação e perpetuação da inflamação da mucosa, característica da DII. De entre as diferentes subpopulações monocitárias, destaca-se um tipo específico de monócitos, designados por CD14⁺CD16⁺, que devido ao seu perfil de secreção de interleucinas (IL), caracteristicamente pro-inflamatórias, parecem desempenhar um importante papel na fisiopatologia da DII.

O tratamento visa controlar os sinais e sintomas, induzir a remissão da doença e a sua manutenção, de forma segura e eficaz, o que é normalmente conseguido à custa de terapêuticas médicas. Os agentes atualmente disponíveis para o tratamento da DII incluem sobretudo derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), corticosteróides, antibióticos, agentes imunomoduladores / imunossuppressores, e mais recentemente, fármacos biológicos, nomeadamente o anticorpo anti-factor de necrose tumoral alfa (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor*) (5).

A 6-mercaptopurina (6-MP) e a sua pró-droga, azatioprina (AZA), são imunossuppressores muito usados nesta área. Ganharam mais importância a partir da década de 90, com o desenvolvimento de estudos que concluíram a favor da sua

utilização. Continuam, por isso, largamente utilizados na atualidade, alterando o curso natural da doença, uma vez que conseguem a manutenção da remissão clínica, quer em monoterapia, quer em terapia combinada com fármacos anti-TNF- α (6, 7).

O metotrexato (MTX), outro imunossupressor que esteve durante vários anos envolvido em controvérsias relativamente à sua eficácia/efetividade, tem visto o seu uso aumentar, na DC, nomeadamente após dois ensaios clínicos randomizados, que evidenciaram a sua eficácia quer na indução (8) da remissão, quer na sua manutenção (9), comparativamente ao placebo. Não existem evidências científicas que suportem o uso do MTX na CU.

A não menos importante, Ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor, com indicação para o tratamento da CU severa, refratária aos corticosteróides (10).

Apesar do surgimento dos agentes anti-TNF- α , há mais de uma década, e da sua importância no tratamento da DC e da CU, os imunossupressores continuam a desempenhar um papel central na abordagem destas doenças. A leucaferese seletiva usando colunas de adsorção com esferas de acetato de celulose ou filtros de fibras de poliéster, que permitem a remoção seletiva dos granulócitos e dos monócitos circulantes, foi alvo de alguns ensaios clínicos nos últimos anos e parece ser um tratamento promissor, especialmente indicado na DII refratária à terapêutica convencional, mas carece ainda de estudos adicionais (11), (12).

ENQUADRAMENTO TEÓRICO / ESTADO DA ARTE

A DII engloba a DC e a CU, duas patologias inflamatórias, crónicas e idiopáticas que atingem o trato gastrointestinal. As duas categorias nosológicas caracterizam-se por apresentarem aspetos clínico-patológicos que se sobrepõem, e outros dos quais diferem claramente.

A patogénese da DII não está completamente compreendida. Parecem existir factores genéticos e ambientais, como a modificação das bactérias luminais e/ou aumento da permeabilidade intestinal, que desempenham um papel importante na má regulação da imunidade intestinal, levando à lesão gastrointestinal.

Estas complexas desordens podem ter uma ampla gama de manifestações e complicações e o seu tratamento irá depender de vários factores distintos, tais como a localização da doença, a sua severidade, e a existência ou não de complicações. O tratamento dos pacientes com DII, deve ser individualizado e adequando a cada caso, com base no alívio sintomático e na tolerância a terapêuticas médicas específicas.

O tratamento médico é sequencial, primeiro tratando a doença na sua fase aguda, e posteriormente, visando a manutenção da remissão. O tratamento cirúrgico pode ser necessário, e deve ser pensado perante a existência de estenoses obstrutivas, lesões cancerosas ou pré-cancerosas, complicações supurativas ou doença refratária à terapêutica médica. (13)

No que respeita à terapêutica médica da DII, esta abrange os aminosalicilatos, corticosteróides, imunossuppressores e fármacos biológicos, embora em alguns casos, nomeadamente, na terapêutica de curta duração da DC, se recorra ainda aos antibióticos (14). Nas últimas décadas, os avanços no conhecimento da fisiopatologia destas doenças, o surgimento de novos fármacos, bem como o conhecimento da existência de factores modificadores aquando do diagnóstico, e de factores predisponentes para doença complicada culminaram em alterações significativas na terapêutica da DII (5).

Doença inflamatória intestinal

Doença de Crohn

A DC pode atingir qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a boca até ao ânus, caracterizando-se por envolvimento focal e transmural, além de poder ainda apresentar manifestações extraintestinais.

Muitos esforços têm sido feitos nos últimos anos, para melhor perceber a fisiopatologia desta doença, e assim tornar a sua classificação mais precisa, de formar a conseguir um melhor aconselhamento dos pacientes, prognóstico, e escolha da

terapêutica adequada a cada subtipo. A classificação atualmente usada para a DC, – classificação de Montreal, resultou de uma revisão da classificação de Viena, definida em 1998 (15). Mantendo os mesmos 3 parâmetros chave, já previamente estabelecidos, idade de diagnóstico, localização e comportamento da doença, a classificação de Montreal, distingue-se sobretudo pelas modificações realizadas em cada um destas componentes (16). (Quadro 1)

Quadro 1. Classificação de Viena e de Montreal para a Doença de Crohn

Table 1 Vienna and Montreal classification for Crohn's disease		
	Vienna	Montreal
Age at diagnosis	A1 below 40 y A2 above 40 y	A1 below 16 y A2 between 17 and 40 y A3 above 40 y
Location	L1 ileal L2 colonic L3 ileocolonic L4 upper	L1 ileal L2 colonic L3 ileocolonic L4 isolated upper disease*
Behaviour	B1 non-stricturing, non-penetrating B2 stricturing B3 penetrating	B1 non-stricturing, non-penetrating B2 stricturing B3 penetrating p perianal disease modifier†

*L4 is a modifier that can be added to L1–L3 when concomitant upper gastrointestinal disease is present.
†"p" is added to B1–B3 when concomitant perianal disease is present.

Fonte: J Satsangi, M.S.S., S Vermeire, J-F Colombel, *The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications*. Gut, 2006. **55**: p. 750

A doença pode atingir qualquer grupo etário, sendo mais frequentemente diagnosticada no final da adolescência e início da vida adulta (17). O diagnóstico baseia-se em características endoscópicas, imagiológicas e histológicas, para além dos achados sintomáticos, físicos e laboratoriais (18).

Apresenta uma elevada heterogeneidade de manifestações, podendo surgir insidiosamente, apresentar características que se sobrepõem a outras doenças inflamatórias ou apresentar-se inicialmente sem manifestações gastrointestinais, o que no seu conjunto contribui para a dificuldade inerente ao diagnóstico (19). Enquanto doença crónica, não é curável por via farmacológica nem cirúrgica, necessitando de intervenções terapêuticas para induzir e manter o controlo sintomático, melhorar a qualidade de vida e minimizar as complicações e toxicidade a curto e longo prazo (20).

Os sintomas principais englobam diarreia crónica ou noturna, dor abdominal, perda de peso, vômitos, febre e/ou sangramento, e os sinais acompanhantes podem incluir palidez, caquexia, massa ou dor abdominal e/ou fistulas, fissuras ou abscessos perianais (21), (22). As manifestações clínicas que surgem com a DC, vão depender

sobretudo do comportamento da doença – estenosante, penetrante, ou não estenosante e não penetrante, e da localização – tubo digestivo alto ou baixo (íleon, íleon e cólon ou cólon), além da existência ou não de envolvimento perianal, da idade de início e da concomitância de manifestações extraintestinais (23), (24), (25). Os sintomas extraintestinais associados à DC podem advir do envolvimento de diferentes sistemas, desde músculo-esquelético, dermatológico, hepatobiliar, ocular, renal e pulmonar, o que constitui um enorme desafio para os profissionais que lidam com estes doentes (26).

Colite Ulcerosa

A CU é uma patologia crónica e recidivante, que se apresenta como inflamação intestinal não transmural, estando o atingimento do trato gastrointestinal limitado ao cólon, apesar de poder cursar, tal como a DC, com manifestações extraintestinais. A CU é a forma mais comum de doença inflamatória intestinal em todo o mundo (27). É menos propensa a complicações, uma vez que o seu curso é leve em 40-50% dos pacientes. Contudo, os pacientes que apresentam um atingimento mais extenso pela doença, estão sob maior risco de necessidade de cirurgia (28).

A classificação de Montreal para a CU, tem em conta a extensão da doença, que pode variar ao longo do tempo, e permite a sua classificação em três subgrupos (29), (30). Esta classificação é relevante em termos biológicos, sobretudo para efeitos de prognóstico de resposta à terapêutica. Outros importantes factores preditores de prognóstico e que apresentam relação com a classificação de Montreal incluem as taxas de utilização de medicação, a hospitalização, a colectomia e o risco de malignidade (16), entre outros. (Quadro 2)

Quadro 2. Classificação de Montreal para a extensão da Colite Ulcerosa

Table 2 Montreal classification of extent of ulcerative colitis (UC)		
Extent	Anatomy	
E1	Ulcerative proctitis	Involvement limited to the rectum (that is, proximal extent of inflammation is distal to the rectosigmoid junction)
E2	Left sided UC (distal UC)	Involvement limited to a proportion of the colorectum distal to the splenic flexure
E3	Extensive UC (pancolitis)	Involvement extends proximal to the splenic flexure

Fonte: J Satsangi, M.S.S., S Vermeire, J-F Colombel, *The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications*. Gut, 2006. **55**: p. 750

O diagnóstico de CU efetua-se conjugando dados da apresentação clínica, endoscópicos e histológicos. É também fundamental excluir potenciais imitadores da doença, causadores de colite infecciosa, através da pesquisa de microrganismos infecciosos nas fezes (19), (31).

As manifestações clínicas mais comuns, incluem tenesmo e diarreia sanguinolenta ou mucolenta e dor abdominal, e no que respeita às manifestações extraintestinais, são semelhantes às já referidas para a DC, sendo sobretudo reumatológicas, hepáticas, dermatológicas e oftalmológicas (32).

Etiopatogenia e fisiopatologia da doença inflamatória intestinal

Apesar dos esforços desenvolvidos para o esclarecimento da etiopatogenia e fisiopatologia da DII, os factores implicados na génese da doença e a forma como se estabelece, progride e perpetua a reação inflamatória, continuam a ser alvo de discussão na comunidade médica e científica. De facto, está ainda por esclarecer a real contribuição de diversos factores – agentes infecciosos, factores de natureza ambiental, genética, imunológica e até mesmo psicogénica.

Uma das hipóteses mais apoiadas para justificar a patogenia da DII, é a do desenvolvimento de uma resposta imune excessivamente agressiva, a uma população de bactérias comensais entéricas, em indivíduos geneticamente suscetíveis, sendo o início e as recidivas da doença despoletadas por factores ambientais (33).

Foram já identificados genes e mutações associados à DC. O gene mais extensivamente estudado é o NOD2, localizado no cromossoma 16 (34), (35), sendo a principal mutação envolvida a CARD15/NOD2 (36). Enquanto a doença estenosante, o surgimento precoce de manifestações e/ou as fistulas parecem ser mais comuns nos doentes com a variante NOD2 (37), a DC ileal associa-se mais frequentemente à variante CARD15 (33). Um outro gene que apresenta relação com a DII é o gene de resistência a múltiplas drogas tipo 1 (MDR1, do inglês *Multiple Drug Resistance type 1*), sobretudo no que respeita à CU (38). A sua importância reside sobretudo na associação que parece ter com a refratariedade à terapêutica (39), e no facto de se ter verificado que ratos nos quais o MDR1 fora deletado, desenvolveram CU (40).

Está também demonstrado que a imunidade da mucosa dos pacientes com DII sofre importantes alterações (41). Quer a resposta imunitária inata, quer a adaptativa estão ativadas na DC e CU, verificando-se um maior recrutamento de células efectoras do sistema imunitário, e consequentemente libertação de citocinas pro-inflamatórias, culminando na perda de tolerância aos comensais entéricos (33). Além disso, a sobrevivência destas células parece estar aumentada, como consequência da diminuição da apoptose celular (33).

A flora entérica microbiana parece agir como indutor da DII, por originar uma inflamação intestinal crónica (33). Vários estudos verificaram que animais criados sob condições isentas de flora microbiana, não desenvolviam inflamação intestinal (42). Já nos seres humanos, tem sido demonstrada a existência de vários anticorpos séricos contra microrganismos, o que favorece a suspeita de uma reatividade imune contra microrganismos intestinais. Contudo, até à data, não está ainda completamente compreendido de que forma a flora entérica causa a inflamação crónica. Duas das hipóteses, incluem uma perda transitória da barreira da mucosa, que despoleta a doença, e num indivíduo geneticamente suscetível progride para a cronicidade, e a existência de uma infeção persistente ou transitória, que com a rutura da barreira, favorece o início do processo inflamatório (41).

Vários factores ambientais são também conhecidos, como estando implicados na DII. Destes destacam-se o tabaco, protetor na CU, mas fator de risco na DC, a dieta, o uso de antibióticos e de anti-inflamatórios não esteroides (AINE), o stress e a infeção. Estes factores parecem agir sobre a integridade da barreira mucosa, a resposta imunológica e o microambiente luminal, exercendo assim a sua ação na alteração da suscetibilidade à inflamação (17).

Apesar da etiologia da DC e CU ser ainda bastante incompreendida, sabe-se que, a infiltração da lâmina própria por linfócitos e leucócitos ativados parece ser um contributo bastante importante para o desenvolvimento da inflamação intestinal e para a sua perpetuação (43), (44) .

Papel dos monócitos CD14⁺CD16⁺

Os monócitos desempenham importantes papéis na imunidade e defesa dos indivíduos. Exercem as suas funções através da fagocitose de microrganismos opsonizados, digestão, processamento e apresentação de antígenos estranhos; libertam também uma grande quantidade de moléculas intervenientes na inflamação (45).

Nos humanos, os monócitos circulantes são divididos em duas subpopulações, com base na expressão de CD14, o recetor para o lipopolissacarídeo das bactérias Gram negativas (LPS, do inglês *Lipolysaccharide*), e de CD16, o recetor tipo III para o fragmento Fc da IgG (Fcγ RIII) (46). Estas subpopulações monocitárias expressam diferentes moléculas na membrana (recetores celulares, moléculas de adesão, etc.) e produzem diferentes mediadores da resposta imune, nomeadamente citocinas (47).

A subpopulação clássica de monócitos, distintamente mais abundante no sangue periférico, expressa um alto nível de padrão de reconhecimento para o recetor CD14, sem coexpressar CD16, sendo por isso designada CD14^{forte}CD16⁻ ou, simplesmente,

CD14⁺CD16⁻ (48). Esta população produz caracteristicamente citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (45).

Ziegler-Heitbrock et al, descreveram, em 1988, a existência de uma outra subpopulação de monócitos, que coexpressa CD16 e baixos níveis de CD14 (CD14^{+fraco}CD16⁺ ou, simplesmente, CD14⁺CD16⁺), tendo esta sido estudada por citometria de fluxo (49). Um ano depois, uma descrição mais detalhada do fenótipo e função destas células, demonstrou que se tratava realmente de um tipo único de monócitos (46). Os monócitos CD14⁺CD16⁺ exibem um padrão de produção de citocinas distinto, com baixa produção de IL-10, mas altos níveis de produção de moléculas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-2, além de serem mais eficientes enquanto células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cells*), comparativamente aos monócitos CD14⁺CD16⁻ (50), (51).

Os monócitos CD14⁺CD16⁺ apresentam altos níveis de HLA-DR, o que permite prever uma grande atividade de apresentação de antígenos nestas células (46). Para além disso, os monócitos podem diferenciar-se em macrófagos ou células dendríticas, sendo que, os monócitos CD14⁺CD16⁺ migram e originam preferencialmente células dendríticas, com uma capacidade de aloestimulação superior (52).

Estas duas subpopulações de monócitos, CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺, apresentam um perfil distinto de expressão de recetores de quimiocinas, o que lhes confere a capacidade para migrarem para diferentes tipos de tecidos e em diferentes condições fisiológicas, em resposta a diferentes quimiocinas. Assim, enquanto os monócitos CD14⁺CD16⁻ expressam altos níveis dos recetores de quimiocinas CCR1, CCR2 e CXCR2 e baixos níveis de CXCR3, os monócitos CD14⁺CD16⁺, expressam níveis elevados de CXCR3 e baixos níveis de CCR2 (53) (54). Consequentemente, os primeiros respondem à quimiocina CCL-2 (também designada MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), enquanto os segundos parecem responder à quimiocina CXCL1 (também designada fractalina), tal como verificado em ensaios de migração transendotelial (54). Vários estudos mostraram que, a migração dos monócitos para os locais de inflamação, é mediada pela quimiocina CCL2 (50). No entanto, estudos *in vivo* relativos à migração desta população, verificaram que, a subpopulação CD14⁺CD16⁺, não migrava em resposta a CCR2, facto que é consistente com a ausência de CCR2 nestas células (53). Posteriormente, *Ancuta et al*, demonstraram que, os monócitos CD14⁺CD16⁺ migravam em resposta a CXCL1 e CXCL12 (54), e observaram que estes monócitos aderiam mais fortemente ao endotélio, o que em parte seria mediado por CXCL1, expresso na superfície das células endoteliais (55).

Com as descobertas feitas em torno dos monócitos CD14⁺CD16⁺, sugeriu-se que estes desempenhassem um importante papel na patogénese das doenças inflamatórias (56). Em várias doenças, foi entretanto observado uma expansão desta população celular, nomeadamente na sépsis bacteriana (57), e na artrite reumatoide (58), entre outras. Já vários estudos demonstraram aumentos significativos dos níveis de monócitos CD14⁺CD16⁺ em pacientes com DC ativa (56), facto que não foi verificado em pacientes com doença quiescente. No estudo de *S. Koch et al*, o sangue periférico de voluntários saudáveis e de pacientes com DC quiescente e ativa foi analisado por citometria de fluxo, tendo-se observado que nos indivíduos saudáveis, a contagem de monócitos CD14⁺CD16⁺ foi apenas de aproximadamente 10%, enquanto nos indivíduos com DC ativa foi de aproximadamente 18.9%, contrastando com os 12,1% dos pacientes com doença quiescente (56). No que diz respeito à CU, os dados até há data são relativamente controversos, com autores a negarem a elevação significativa desta subpopulação monocitária nos indivíduos com CU ativa, e outros a demonstrarem resultados vantajosos perante a leucaferese em pacientes com CU (59).

Tratamento da doença inflamatória intestinal

- **Antibióticos**

A utilização dos antibióticos (ATB) na DII, baseia-se na evidência de que a flora bacteriana intestinal poderá estar implicada na patogénese da doença (60). Nestes pacientes, parece existir um número aumentado de bactérias agressivas, tais como *Bacterioides*, *Escherichia coli* e *Enterococcus*, e um número reduzido de bactérias protetoras como os *Lactobacilos* e *Bifidobacterias* (61).

O conhecimento da importância das bactérias na indução e perpetuação da doença permitiu assim, colocar a hipótese de que a manipulação da flora microbiana poderia ser terapêutica, e estudar os antibióticos como armas no tratamento da DC e CU.

O metronidazol é o ATB mais estudado para a DC. Não existem ainda evidências científicas consistentes, no que respeita à sua eficácia na indução de remissão, comparativamente a controlos e a outros ATB estudados (62), no entanto, ele parece reduzir o índice de atividade da doença (63).

A ciprofloxacina é outro ATB utilizado na DC, cuja eficácia parece ser comparável à da mesalanina (64). Este fármaco mostrou-se também importante quando utilizado como terapia combinada, em pacientes com doença resistente (65).

Para o tratamento da DC, os ATB estão indicados quando existem complicações sépticas, doença perineal e se estiver presente sintomatologia atribuível a um supercrescimento bacteriano (66).

A utilização de ATB's na CU é ainda controversa, e não existem evidências científicas que a suportem. Contudo, eles são empregues com alguma frequência, sobretudo como terapia adjuvante na doença severa. O metronidazol é o principal ATB utilizado na CU, tendo apresentado resultados vantajosos na indução da remissão da doença grave, quando combinado com corticosteroides (67).

- **Derivados do ácido 5-aminosalicílico**

Os derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), estiveram durante várias décadas, a par com os corticosteroides, na base da terapia farmacológica da DII (68). Parecem atuar localmente na mucosa intestinal, reduzindo a inflamação através de vários processos anti-inflamatórios. A sulfassalazina (salazopirina) é o fármaco protótipo do grupo dos aminosalicilatos, mas a messalazina é atualmente o aminosalicilato mais usado neste âmbito (69), (70).

A sulfassalazina foi o primeiro fármaco do grupo dos 5-ASA a ser utilizada no tratamento da DII. Contudo, foi associada a reações alérgicas e a um número significativo de efeitos secundários, devido à intolerância ao seu componente sulfapiridina, o que limita a sua utilização. Por este motivo foi necessário desenvolver preparações que protegessem o 5-ASA da degradação gástrica. Uma das preparações consiste na incorporação do 5-ASA num pró-fármaco, no qual está covalentemente ligado a um transportador inativo, enquanto a outra compreende a sua incorporação num revestimento acrílico, sensível ao pH, que atrasa a sua libertação para o cólon distal (69).

Os 5-ASA constituem um grupo de fármacos seguros, que podem ser administrados por via oral ou rectal, para tratamento da inflamação em diferentes zonas do trato gastrointestinal. São sobretudo utilizados no tratamento da CU leve a moderada, e como terapêutica de manutenção durante a remissão, mostrando-se geralmente eficientes e bem tolerados (70), (71). No que à DC diz respeito, apesar de em tempos terem sido largamente utilizados, aparentam ter um papel bastante mais limitado (68), não existindo estudos suficientes que permitam concluir sobre a sua utilização, nomeadamente em tratamento de manutenção (70), (72).

- **Corticosteróides**

Os corticosteróides são bastante usados no tratamento de uma ampla gama de doenças autoimunes e inflamatórias, entre as quais a CU e DC. São fármacos que atuam suprimindo a inflamação, através do bloqueio das suas manifestações iniciais. As consequências tardias resultantes da inflamação, como a ativação de fibroblastos, proliferação vascular e deposição de colagénio, são também suspensas.

Adicionalmente, os corticosteróides interferem ainda na resposta dos linfócitos T aos antígenos, diminuem a produção de citocinas inflamatórias e interferem com a produção do fator de necrose tumoral KB (73).

Os corticosteróides podem ser usados por via oral e sob a forma de enemas, isoladamente ou em associação com outros fármacos, tendo aplicação quer na DC, quer na CU. Na CU, a corticoterapia continua a ser um ponto-chave da terapêutica médica, com aplicação sistémica na fase aguda da colite moderada a severa e utilizada topicamente e como segunda linha no tratamento agudo da proctite ou proctosigmoidite em pacientes intolerantes ou sem resposta à mesalanina (74). Não existem evidências que suportem a sua utilização como terapêutica de manutenção.

Na DC os corticosteróides são também muito importantes na indução da remissão, sendo usados no tratamento da doença moderada a severa. O budesonido pode ainda ser utilizado na doença ileal ligeira ou ileo-cólica ligeira a moderada, e é frequentemente utilizado como complemento de outros fármacos (75). Os corticosteróides não são recomendados como terapêutica de manutenção e em alguns pacientes a doença pode ter uma evolução corticodependente ou corticorresistente (66).

- **Imunossupressores**

- Azatioprina e 6-Mercaptopurina

A AZA e a 6-MP são os principais imunossupressores utilizados na DC e CU. Estes fármacos pertencentes à classe das tiopurinas, possuem um metabolismo complexo, ainda não completamente compreendido. A AZA é metabolizada a 6-MP, que por sua vez é metabolizada em 6-tioisonina 5'-monofosfato. Este último é convertido em 6-TGN, o metabolito ativo que conduz à inibição da síntese do DNA e RNA, e assim, à apoptose das células T. A 6-MP pode ainda ser metabolizada em ácido 6-tiourico pela enzima xantina oxidase ou em 6-metil mercaptopurina (6-MMP) pela enzima tiopurina metil-transferase (TPMT), dando assim origem a metabolitos inativos. As 3 enzimas que metabolizam a 6-MP estão em constante competição pelo substrato, sendo que os metabolitos originados dependem da concentração destas enzimas (76).

A atividade da TPMT é determinada geneticamente (77). Em aproximadamente 0.3% da população geral, esta enzima encontra-se ausente ou apresenta baixos níveis de atividade, em 11% apresenta níveis intermediários de atividade, e 89% tem níveis normais ou elevados da TPMT. No entanto, estudos anteriores revelaram que apenas ¼ dos casos de leucopenia, tinham como causa este polimorfismo genético (76).

A principal preocupação no que respeita aos efeitos secundários a curto prazo da 6-MP e AZA é a supressão medular, que ocorre em cerca de 2 a 5% dos pacientes

tratados com estes agentes, sendo a leucopenia a manifestação mais comum (78), (79). Este efeito relaciona-se com a dose, e é controlado com a sua redução, ou suspensão do fármaco, recomendando-se a monitorização rotineira através de contagem de células sanguíneas. Alguns autores aconselham a obtenção de um hemograma completo, que nas primeiras quatro semanas deverá ser obtido semanalmente, nas quatro seguintes, de duas em duas semanas, e posteriormente a cada 1 ou 2 meses, enquanto a terapêutica com estes imunossuppressores se mantiver (80).

A pancreatite tem sido referida como efeito secundário, que surge em cerca de 1.3%-3.3% dos pacientes tratados com 6-MP e AZA para a DII, manifestando-se normalmente nas primeiras 3-4 semanas de tratamento. Este efeito lateral é independente da dose, sendo normalmente resolvido quando o fármaco é descontinuado. Outras manifestações que podem ocorrer numa fase inicial, incluem náuseas, vômitos e dor abdominal, mas são usualmente leves, e melhoram após algum tempo ou com a redução da dose. Reações não específicas como febre, *rash* e artralgias, são habitualmente independentes da dose e resolvem com suspensão do fármaco (79), (80), (81), (82). Alguns indivíduos podem ainda desenvolver reações alérgicas com a 6-MP e tolerarem a subsequente administração de AZA (83) e vice-versa (84). A hepatotoxicidade é uma complicação rara destes fármacos (82).

Algumas complicações infecciosas têm sido relatadas, em vários estudos, como estando associadas à utilização de AZA e 6-MP na DC e CU. Estas incluem infeção por citomegalovirus disseminada, abscesso hepático, pneumonia, encefalite por *Listeria*, herpes zóster, flebite séptica com artrite, hepatite vírica, febre Q e colite por Citomegalovirus, muitas delas ocorrendo na ausência de leucopenia (79), (85), (86). No entanto, um outro estudo relativamente recente, sugeriu que o recurso a AZA e 6-MP no pré-operatório para cirurgia intestinal eletiva, não está, por si só, associado a um aumento significativo do risco de complicações infecciosas pós-operatórias, estando no entanto, este risco aumentado quando há terapêutica combinada com corticosteróides pré-operativamente.

Alguns estudos têm demonstrado um ligeiro aumento do risco de linfoma nos pacientes com artrite reumatoide, tratados com AZA ou 6-MP (87), (88) (89). Vários outros estudos que examinaram o risco de linfoma em pacientes com DII tratados com os mesmos imunomoduladores levaram a conclusões díspares, relativamente a esta relação (90), (91, 92).

A AZA e a 6-MP têm sido usadas desde o início dos anos 70 para o tratamento da DII. Inicialmente, eram apenas utilizadas em pacientes com DC, mas hoje em dia são consideradas igualmente eficientes no tratamento da CU. No entanto, apesar de terem já

mostrado efeitos benéficos ao nível da CU, a sua aplicação na DC é melhor conhecida. De uma forma geral, a aplicabilidade destes fármacos ao nível da DII, remete-se aos casos de doença moderada a severa e doença dependente ou resistente a corticosteróides (93). Além da sua relevância no tratamento de manutenção de DII (94), estes imunossuppressores são também utilizados com bons resultados na manutenção da remissão induzida cirurgicamente (95).

Metotrexato

O MTX é outra alternativa, no que respeita aos imunossuppressores disponíveis para o tratamento da DII. Ele constitui um potente antagonista do ácido fólico, também usado em várias outras patologias inflamatórias crónicas, das quais se destaca a artrite reumatoide. O MTX atua interferindo com a síntese de ADN, uma vez que exerce a sua ação inibindo competitivamente e de forma reversível a dihidrofolato redutase (DHFR). Além disso, apresenta efeitos anti-inflamatórios, exercidos através da indução da apoptose dos linfócitos, da diminuição de citocinas pro-inflamatórias, da acumulação de adenosina nos locais de inflamação, da diminuição de imunoglobulinas e da diminuição da produção de eicosanóide (96), (97), (98).

Os estudos que têm avaliado a aplicação do MTX na CU, mostraram até à data, resultados inconsistentes, sendo que o único estudo randomizado nesta área, não demonstra benefícios comparativamente ao placebo (99). Como tal, este não é um fármaco recomendado no tratamento da CU.

O MTX tem sido utilizado, sobretudo na DC, desde há já alguns anos. Dois estudos randomizados, avaliaram a sua eficácia no tratamento da fase aguda (100) e da fase de manutenção (9) da DC, e em ambos se verificaram resultados positivos, comparativamente ao placebo. As indicações para a sua utilização são as mesmas que para as tiopurinas, no entanto, ele é geralmente reservado para o tratamento da DC refratária ou intolerante às tiopurinas ou aos agentes anti-TNF- α (101). Como tal, destinam-se sobretudo aos pacientes com DC corticodependente, nos quais a AZA ou 6-MP não são uma opção viável (102).

A via de administração do MTX deve ser preferencialmente parentérica, uma vez que a sua administração oral se associa a variabilidades na absorção e redução dos níveis de fármaco. É também aconselhada a suplementação com ácido fólico semanalmente, como forma de prevenir intolerância gastrointestinal (103), o principal efeito secundário precoce.

Os principais efeitos secundários a longo prazo incluem a mielotoxicidade, a pneumonite e a toxicidade hepática. Como tal, recomenda-se a realização de avaliações

analíticas regulares, incluindo hemograma e bioquímica hepática, obtidas antes de iniciar a terapêutica, quatro semanas após o início e, mensalmente, após o primeiro mês (104). A biopsia hepática não está recomendada (66).

Devido à sua teratogenicidade, o tratamento com MTX está contraindicado durante a gravidez e lactação, sendo recomendável um intervalo de alguns meses, entre a suspensão da terapêutica e a concepção (66).

Ciclosporina A

A CsA é um metabolito fúngico, usado como imunossupressor. A sua ação é específica para os linfócitos, uma vez que inibe a IL-2, e deste modo, a função das células T auxiliares é condicionada. Indiretamente, também a libertação de outras populações linfocitárias e o recrutamento de células T citotóxicas fica prejudicada (105). A CsA modula a atividade da calcineurina fosfatase, e com isso consegue a supressão nuclear de factores de transcrição para vários genes que codificam para proteínas envolvidas na inflamação, nomeadamente substâncias pro-inflamatórias, como a IL-2, mas também o TNF- α e o interferão gama (γ -INF) (106).

A CsA é sobretudo utilizada na CU severa, refratária à corticoterapia IV. Nestes pacientes, é administrada por via intravenosa, de forma a conseguir um rápido controlo da doença, evitando assim a cirurgia. Contudo, um grande estudo randomizado, realizado para avaliar a utilização da CsA na CU, evidenciou que a longo prazo, apenas uma minoria evita a colectomia (107), (108). Outros estudos demonstraram que a probabilidade dos pacientes com resposta inicial à CsA virem a necessitar de colectomia, é maior naqueles com tratamento prévio com AZA, sem resposta a este fármaco (108, 109). A CsA visa assim, intervir, sobretudo sobre o risco associado a uma cirurgia urgente (10).

No que respeita à utilidade da CsA na DC, a sua aplicação não parece ser tão importante, nem tão bem conhecida. Não existem ainda evidências científicas que comprovem a sua eficácia no tratamento da DC refratária ou dependente de corticosteróides, pelo que a sua utilização não é recomendada (66). Alguns estudos referem-se à utilidade da CsA na DC fistulizante, não existindo, contudo, estudos randomizados que o suportem (66).

A CsA apresenta risco de toxicidade e efeitos adversos significativos. A maioria destes efeitos adversos são dependentes da dose, pelo que os níveis plasmáticos, devem ser cuidadosamente monitorizados a cada dois dias (107). Além da monitorização dos níveis plasmáticos de CsA, deve também obter-se um hemograma completo, e bioquímica sanguínea, sendo que, nos pacientes que apresentem baixos níveis de

colesterol ou de magnésio, o risco de efeitos adversos aumenta, recomendando-se a redução da dose de CsA (80), (110). Os efeitos adversos mais comuns incluem hipertensão, parestesia ou tremor, e cefaleias (111). A nefrotoxicidade, e o desconforto gastrointestinal, atingem cerca de metade dos pacientes que fazem este fármaco (111). As infeções oportunistas constituem uma preocupação *major* nos pacientes medicados com CsA (111), pelo que se aconselha profilaxia antibiótica com cotrimoxazol, para os pacientes com tratamento superior ou igual a sete dias, ou com imunossupressão tripla, nomeadamente com CsA, AZA e corticosteróides (112).

Em média, os doentes respondem à administração intravenosa de CsA em cerca de quatro a cinco dias. Perante uma resposta à terapêutica, a CsA intravenosa é substituída por CsA oral, em combinação com AZA, ou por AZA em monoterapia (113). Os doentes não respondedores à CsA, têm indicação para colectomia (114), (115).

- **Anticorpos monoclonais - Anti-Factor de Necrose Tumoral**

Os agentes anti-TNF- α , desenvolvidos ao longo das duas últimas décadas, têm vindo a conquistar um papel muito importante no tratamento da DII. Estes fármacos atuam diretamente contra o TNF- α , uma citocina produzida por macrófagos e linfócitos, que desempenha um papel crucial na amplificação e perpetuação da resposta inflamatória na DC e CU (72).

Os anticorpos monoclonais aprovados para o tratamento da DII em Portugal são o Infliximab, de aplicação intravenosa, e o Adalimumab, de uso subcutâneo. A aplicabilidade dos fármacos anti-TNF- α na DC é bastante abrangente. Eles estão recomendados nos pacientes com doença moderada a severa, não respondedores à terapêutica convencional, ou que apresentam contraindicações ou intolerâncias a ela. Estão ainda indicados na doença anal fistulizante, refratária à terapêutica com antibióticos e imunossupressores, sendo mesmo, em algumas circunstâncias, a terapêutica de primeira linha (66). Foi já demonstrado que, a terapêutica com anti-TNF- α , promove não só a cicatrização da mucosa, como também é eficaz enquanto tratamento de manutenção (116), (117).

No tratamento da CU, os anti-TNF- α são igualmente recomendados no tratamento da doença moderada a severa, refratária aos corticosteróides e/ou aos imunossupressores convencionais, bem como em situações de intolerância a estes fármacos (118). Nestas circunstâncias, os anticorpos monoclonais mostraram-se efetivos na indução e manutenção da remissão clínica, na promoção da cicatrização da mucosa, na redução da necessidade de internamento e de colectomia (119).

- **Leucaferese**

Apesar da etiopatogenia da DII não ser completamente compreendida, está claro que a disfunção do sistema imunitário desempenha um papel chave. Por um lado os leucócitos tem a capacidade de iniciar e amplificar a inflamação, e por outro, os granulócitos e monócitos pela sua abundância na mucosa intestinal inflamada, parecem também estar implicados (120).

O grau de infiltração de neutrófilos na mucosa, parece estar quantitativamente associado com a gravidade da inflamação intestinal e com o risco de recidiva na CU e DC (121). Como tal, recentemente têm-se tornado alvo de terapias para DII.

A leucaferese é um método pelo qual, se procede à remoção extracorporeal das células do sistema circulatório, e tem sido avaliada como tratamento de várias doenças autoimunes (122), (123) e da DII (124). Dois tipos de leucaferese têm sido estudados para o tratamento da DII. O ponto comum a ambas é a perfusão do sangue venoso através de uma coluna de adsorção, diferindo entre si, sobretudo na estrutura dessa coluna onde ocorre a filtração (125), (126).

Apesar de mais estudos nesta área serem necessário, a leucaferese parece apresentar efeitos secundários mínimos (127), sendo já utilizada no Japão, no tratamento da DII, nomeadamente da CU (128).

- **Tratamento cirúrgico**

Com o advento e evolução da terapêutica médica, terapêutica cirúrgica da DII têm também sofrido alterações consideráveis.

No que se refere à DC, apesar de uma grande parte de pacientes necessitarem de cirurgia em algum momento, o tratamento é prioritariamente médico. As principais indicações para cirurgia, são os sintomas obstrutivos, e menos frequentemente a doença refratária, hemorragia, perfuração ou abscesso (129). Há que ter em conta os riscos inerentes a estes procedimentos, até porque, à partida, os pacientes submetidos a cirurgia terão formas mais graves de doença, associando-se um risco considerável de complicações cirúrgicas e sépticas (130).

As várias opções cirúrgicas disponíveis para o tratamento da DC, têm diferentes aplicabilidades, consoante a localização da doença e o seu comportamento. Para a doença localizada nos segmentos proximais, as principais opções cirúrgicas incluem a gastrojejunostomia, duodenojejunostomia, gastroduodenostomia e a estrituroplastia, procedimentos associados a morbilidade considerável (131). Contudo, uma vez que a

prevalência da doença nesta localização é pouco comum (23), (132), estes procedimentos não são realizados com muita frequência.

Na doença com sede intestinal, a ressecção do segmento com doença ativa e responsável pela sintomatologia constitui a melhor opção cirúrgica (66), (133). Contudo, no que se refere à doença com comportamento estenosante, a estrituroplastia é uma opção a considerar (134).

Quando a doença envolve o cólon, as opções terapêuticas variam entre a ileostomia derivativa (135), a ressecção segmentar (136) e a coloproctomia total (137), estando a escolha do procedimento dependente da extensão e localização da doença, da urgência da intervenção e do estado geral do doente.

Para a DC com localização perianal, o tratamento é ainda controverso. Hoje em dia, é possível uma abordagem cirúrgica desta manifestação da doença, que deve incluir sempre uma combinação de terapêutica cirúrgica e médica (138).

A cirurgia para a CU tem vindo a ser aprimorada com o objetivo de oferecer aos pacientes que necessitam de colectomia uma melhor qualidade de vida. O *gold-standard* é atualmente a proctocolectomia com construção de bolsa de ileo-anal, que permite a preservação do reflexo de defecação, além de não necessitar de estoma (118). O recurso a este procedimento, como cirurgia eletiva, está indicado para situações de colite refratária à terapêutica médica, existência de displasia ou malignidade e doença estenosante que condiciona obstrução intestinal total ou parcial (139). Em situações de emergência, nomeadamente na presença de megacolon tóxico refratário, perfuração intestinal e hemorragia colorrectal contínua (140), recomenda-se como tratamento cirúrgico numa primeira fase, a colectomia subtotal com ileostomia com preservação do reto (118).

FUNDAMENTOS DO ESTUDO

Problemas

No Centro Hospitalar do Porto (CHP), existe, inserida na especialidade de Gastrenterologia, uma consulta específica de DII, frequentada por um grande número de doentes com DC e CU. Apesar dos dados existentes na literatura, e de vários estudos já realizados neste âmbito, ainda persistem dúvidas, no que respeita à terapêutica que deve ser usada nestes doentes. Assim, considerou-se de elevada relevância, a realização de um estudo que permita caracterizar e avaliar a eficácia e os efeitos adversos dos imunossupressores nestes doentes.

Apesar dos esforços desenvolvidos para o esclarecimento da etiopatogenia e fisiopatologia da DII, os factores implicados na génese da doença e a forma como se estabelece e progride, continuam a ser alvo de discussão, estando ainda por esclarecer a real contribuição dos diversos factores, a natureza dos distúrbios imunológicos associados e o efeito da terapêutica imunossupressora sobre os mesmos.

Questões

O presente estudo visa dar resposta às seguintes questões, em duas fases:

1ª fase

- Quais as características, clínicas e laboratoriais, dos doentes com DII, seguidos no CHP?
- Quais foram as indicações para iniciar terapêutica imunossupressora?
- Qual foi a eficácia destas terapêuticas?
- Quais os efeitos secundários associados aos imunossupressores?
- Qual foi a duração média destas terapêuticas?
- O que motivou a alteração da terapêutica em alguns pacientes?

2ª fase

- Quais o papel dos monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺CD16⁺) na DII?
- Qual o efeito da terapêutica imunossupressora sobre estas células?

Objetivos do estudo

Caracterizar a utilização de terapia imunossupressora em pacientes com CU e DC, acompanhados na Consulta de Gastroenterologia (CGE) do CHP.

Investigar do papel dos monócitos CD14⁺CD16⁺ na fisiopatologia da doença e na resposta ao tratamento com imunossupressores (azatioprina ou metotrexato).

INTERVENIENTES

Instituições, Departamentos e Serviços

- Centro Hospitalar do Porto (CHP)
 - Hospital de Santo António (HSA)
 - Departamento de Medicina (DM)
 - Serviço Gastrenterologia (SGE)
 - Consulta de Gastrenterologia (CGE)
 - Serviço Hematologia Clínica (SHC)
 - Laboratório de Citometria (LC)

Equipa de Investigação

Constituição

Aluno

- Rita Dias (Rita Ribeiro Dias): aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP.

Orientadores do projeto

- Paula Lago, (Paula Maria Lago Vieira Santos), médica, especialista em Gastrenterologia, assistente hospitalar graduada, SGE do HSA/CHP (Orientador).

Supervisor da DIIC

- Margarida Lima (Margarida Maria de Carvalho Lima), médica especialista em Imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada, responsável pelo LC do SHC do HSA/CHP; Professora Auxiliar Convidada do ICBAS/UP; Regente da DIIC.

Outros investigadores

- João Rodrigues (João Bernardo C P S Rodrigues) Técnico Superior de Saúde (TSS) do SHC do HSA/CHP, a exercer funções na Unidade de Biologia Molecular e no LC do SHC.

Funções e responsabilidades

- A conceção e elaboração da proposta e a execução do projeto são da responsabilidade da Aluna;
- A Orientadora acompanhará a aluna na elaboração de proposta, na execução do projeto e na análise e interpretação dos resultados;

- A Regente da DIIC supervisionará todas as fases do projeto, desde a sua conceção até à apresentação dos resultados, passando pela sua execução e análise/interpretação dos dados;
- Os restantes investigadores colaborarão em aspetos específicos do projeto, conforme especificado adiante.

Tempo dedicado ao projeto

Nome e apelido	Função	% Tempo de dedicado ao projeto	Nº de meses	Pessoas * Mês
Rita Dias	Aluno	15,0%	22	3,30
Paula Lago	Orientador	2,5%	22	0,55
Margarida Lima	Supervisor	2,5%	22	0,55
João Rodrigues	Investigador	10,0%	6	0,60
Total				5,00

Condições e motivações para a realização do estudo

Capacidades instaladas e recursos disponíveis:

A revisão dos processos clínicos eletrónicos será realizada no SGE do HSA/CHP, em sala e computador indicados pelo orientador.

A revisão dos processos clínicos em papel será realizada no Arquivo Clínico (ex.CICAP), após requisição dos mesmos, em sala reservada para tal.

A colheita do sangue dos pacientes selecionados será realizada na Sala de Colheitas (ex.CICAP), após consulta de GE e encaminhamento.

A análise do sangue por citometria de fluxo realizar-se-á no Laboratório de Citometria do SHC do HSA/CHP.

Mérito da equipa de investigação

A orientadora, Dra. Paula Lago, é médica especialista em Gastroenterologia, e com uma grande experiência na área das Doenças Inflammatoryas Intestinais, nomeadamente a Doença de Crohn e a Colite Ulcerosa. É uma das profissionais que realiza no CHP a consulta de Doença Inflammatorya Intestinal e têm ainda uma vasta atividade científica, traduzida pela colaboração em projetos de investigação e estudos multicêntricos e pela publicação de vários artigos científicos. As suas atividades de investigação centram-se na área da Doença de Crohn e Colite Ulcerosa, pelo que esta experiência contribui para assegurar que o presente estudo será conduzido de acordo com as Boas Práticas.

Motivações pessoais para a realização do estudo

As minhas motivações para a realização deste projeto e posterior trabalho de investigação, passaram, por um lado, pelo desejo de obter mais conhecimentos acerca da investigação clínica e por outro, pela área e o tipo de patologia em questão. Com este trabalho pretendo contribuir para a nível para a minha aquisição de competências na área da investigação clínica, e ambientar-me com todo o processo de realização de um trabalho de investigação, desde o seu desenho à sua execução, e ainda procurar aumentar os conhecimentos especificamente no que respeita à amostra com a qual se trabalha no CHP, numa área da qual gosto (Gastroenterologia), e em relação a doenças crónicas. Considero de extrema importância a continua investigação em doenças crónicas, uma vez que são doenças que afetam seriamente a qualidade de vida dos doentes, pelo que tudo deve ser feito no sentido de diminuir a morbilidade e até mesmo, procurar a cura para estas doenças.

METODOLOGIA

Critérios de revisão da literatura

A revisão da literatura foi realizada, consultando, através da PubMed, artigos originais e de revisão, redigidos em inglês, indexados na Medline e publicados entre 1980 e 2012.

As principais palavras-chave usadas na pesquisa foram: Doença Inflamatória Intestinal; Doença de Crohn; Colite Ulcerosa; tratamento; imunossuppressores; leucaferese; monócitos CD14⁺CD16⁺.

Desenho do estudo

Tipo de estudo

Estudo institucional de série de casos, de carácter observacional e transversal, de natureza clínica, com um componente longitudinal, prospetivo e laboratorial num subgrupo de casos.

Fases do estudo

O estudo será desenvolvido em duas fases:

Na 1ª fase (estudo de série de casos) será efetuada a revisão casuística dos doentes com DII seguidos na CGE do CHP.

Na 2ª fase será efetuado o estudo laboratorial de um subgrupo de doentes com DII que iniciem tratamento com imunossuppressores (azatioprina ou metotrexato), entre Junho e Dezembro de 2012, antes e 3 meses após o início do tratamento.

Universo, população e amostra

Universo

- Doentes adultos com DII.

População

- Doentes adultos com DII, seguidos na CGE do CHP.

Estimamos que sejam seguidos, atualmente, nesta consulta cerca de 900 doentes com DII.

- Doentes adultos com DII, seguidos na CGE do CHP, tratados com imunossuppressores.

Estimamos que sejam seguidos, atualmente, nesta consulta cerca de 250 doentes com DII tratados com imunossuppressores.

Amostra

- Na primeira fase do estudo, pretende-se que a amostra coincida com a população.
- Na segunda fase do estudo, a amostragem será feita de forma não aleatória, por conveniência (consecutiva) estimando-se que sejam incluídos 20 doentes.

Seleção dos participantes

Para o estudo de série serão selecionados os doentes com DII seguidos na CGE do HSA/CHP entre 1980 e 2012.

Para o estudo laboratorial serão selecionados os doentes com DII que iniciarem tratamento com imunossuppressores entre Julho de 2012 e Novembro de 2012.

Critérios de elegibilidade

Critérios de inclusão

1ª Fase: Ter diagnóstico de DII estabelecido com base nos critérios de Lennard-Jones (141, 142); ser seguido na Consulta de GE do CHP entre 1980 e 2012.

2ª Fase: Ter diagnóstico de DII estabelecido com base nos critérios de Lennard-Jones (141, 142); ter idade igual ou superior a 18 anos; ser seguido na CGE; ter necessidade de iniciar tratamento com imunossupressor entre Julho e Novembro de 2012; nunca ter realizado tratamento com imunossupressor ou ter feito a sua suspensão há mais de 12 meses; assinar de forma livre e esclarecida o consentimento informado.

Critérios de exclusão

1ª Fase: Inexistência de processo clínico e/ou insuficiência de dados no processo.

2ª Fase: Fazer tratamento com imunossupressor para outra patologia que não DII.

PLANO DE TRABALHO

Tarefas associadas ao projecto

- **Lista de tarefas**

Durante a execução do projeto estão previstas as seguintes tarefas:

	Designação	Início	Conclusão	Duração
1	Estudo de série (revisão casuística)	01/06/2012	31/09/2012	4 meses
2	Identificação dos doentes que irão iniciar azatioprina	01/06/2012	31/09/2012	4 meses
3	Recrutamento de doentes para estudo laboratorial	01/07/2012	31/11/2012	5 meses
4	Colheitas de sangue	01/07/2012	29/02/2013	8 meses
5	Estudo dos monócitos do sangue	01/07/2012	29/02/2013	8 meses
6	Análise, interpretação e integração dos resultados	01/03/2013	30/04/2013	2 meses
7	Relatório de execução	01/05/2013	31/05/2013	1 mês

- **Descrição das tarefas**

Tarefa 1: Estudo de série (revisão casuística)	
Duração:	4 meses
Data prevista para o início:	01/06/2012
Data prevista para a conclusão:	31/09/2012
Instituições, Departamentos e Serviços:	CHP/HSA, DM, SGE
Objetivos:	Caracterizar, do ponto de vista clínico e analítico os doentes com DII seguidos na CGE entre 1980 e 2012.
Descrição:	Colheita de dados clínicos e analíticos dos processos clínicos; registo dos dados em ficheiro Excel anonimizado.
Investigadores envolvidos:	Rita Dias, Paula Lago
Funções e responsabilidades dos investigadores:	A colheita dos dados será efectuada pela aluna com a supervisão da orientadora.

Tarefa 2: Identificação dos doentes que irão iniciar Azatioprina	
Duração:	4 meses
Data prevista para o início:	Dia/mês/ano: 01/06/2012
Data prevista para a conclusão:	Dia/mês/ano: 31/09/2012
Instituições, Departamentos e Serviços:	HSA/CHP, DM, SGE
Objetivos:	Identificar os doentes com indicação para iniciar imunossupressão com Azatioprina
Descrição:	Consulta do agendamento (SAM)
Investigadores envolvidos:	Paula Lago
Funções e responsabilidades dos investigadores:	Os procedimentos acima descritos serão da responsabilidade da Dra. Paula Lago

Tarefa 3: Recrutamento dos doentes	
Duração:	5 meses
Data prevista para o início:	Dia/mês/ano: 01/07/2012
Data prevista para a conclusão:	Dia/mês/ano: 31/11/2012
Instituições, Departamentos e Serviços:	CHP/HSA, DM, CGE
Objetivos:	Informar os doentes, solicitar a participação na 2ª fase do estudo e obter o consentimento informado.
Descrição:	Informação dos doentes; entrega do folheto informativo; solicitação para participação no estudo; assinatura do termo de consentimento informado.
Investigadores envolvidos:	Paula Lago; Marta Salgado; Cidalina Caetano
Funções e responsabilidades dos investigadores:	Os procedimentos acima descritos serão da responsabilidade da Dra. Paula Lago.

Tarefa 4: Colheitas de amostras de sangue	
Duração:	8 meses
Data prevista para o início:	01/07/2012
Data prevista para a conclusão:	29/02/2013
Instituições, Departamentos e Serviços:	CHP/HSA, Central de Colheitas
Objetivos:	Colher sangue para análise
Descrição:	Procedimento de colheita de sangue para estudo dos monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁺
Investigadores envolvidos:	Técnicos da Central de Colheitas
Funções e responsabilidades dos investigadores:	Colheita de amostra de sangue (1 tubo de 4.5 ml; EDTA-K3) antes e 3 meses após início do tratamento.

Tarefa 5: Estudo dos monócitos do sangue	
Duração:	8 meses
Data prevista para o início:	01/07/2012
Data prevista para a conclusão:	29/02/2013
Instituições, Departamentos e Serviços:	CHP/HSA, DM, SHC, LC
Objetivos:	Estudo dos monócitos sanguíneos por citometria.
Descrição:	Realização de análises; análise de resultados
Investigadores envolvidos:	Rita Dias, João Rodrigues
Funções e responsabilidades dos investigadores:	O Dr. João Rodrigues será responsável pela realização das análises e pela análise dos resultados da citometria; a aluna acompanhará o processo.

Tarefa 6: Análise, interpretação e integração dos resultados	
Duração:	2 meses
Data prevista para o início:	01/03/2013
Data prevista para a conclusão:	30/04/2013
Instituições, Departamentos e Serviços:	CHP/HSA, DM, SGE
Objetivos:	Analisar, interpretar e integrar os resultados
Descrição:	Interpretação dos resultados laboratoriais, integrados no contexto clínico.
Investigadores envolvidos:	Rita Dias, Paula Lago.
Funções e responsabilidades dos investigadores:	A análise, interpretação dos resultados serão da responsabilidade da aluna, com a ajuda e a supervisão da orientadora.

Tarefa 6: Relatório de execução	
Duração:	1 mês
Data prevista para o início:	01/05/2013
Data prevista para a conclusão:	31/05/2013
Instituições, Departamentos e Serviços:	CHP/HSA, DM, SGE
Objetivos:	Elaborar o relatório de execução do projeto, a integrar na dissertação de MIM
Descrição:	Resultados; Discussão; Conclusões
Investigadores envolvidos:	Rita Dias, Paula Lago.
Funções e responsabilidades dos investigadores:	A elaboração do relatório será da responsabilidade da aluna, com a ajuda e a supervisão da orientadora.

MATERIAL E MÉTODOS

Revisão casuística

Para a colheita dos dados clínicos e analíticos será usado o formulário em anexo.

Estudo laboratorial

A imunofenotipagem dos monócitos de sangue periférico será efetuada por técnica de imunofluorescência direta.

Resumidamente, as células (sangue total) serão incubadas à temperatura ambiente com a quantidade apropriada de anticorpos monoclonais específicos para diversos antígenos (CD14, CD16, CD36, CD45, etc.), conjugados com diferentes fluorocromos (FITC, PE, PerCP, APC, etc.). Após incubação, será feita a lise dos eritrócitos e fixação das membranas dos leucócitos (FACSlising, Becton Dickinson, seguida de uma lavagem com tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*), adição de PBS e leitura no citómetro de fluxo (FACSCanto, Becton Dickinson).

A análise dos resultados será feita na aplicação informática Infinicyt (Cytognos).

Análise estatística dos dados

Os dados serão analisados utilizando o programa de análise estatística SPSS.

Equipamento

Tipo de equipamento	Marca	Modelo	Local
Contador hematológico	Beckman Coulter	LH780	LC do SHC do CHP
Citómetro de fluxo	Becton Dickinson	FACSCanto	LC do SHC do CHP

Reagentes e outro material consumível

Descrição	Finalidade
Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos	Imunomarcacão dos monócitos (citometria de fluxo)
Outros reagentes de laboratório	Lavagem das células, lise dos eritrócitos e fixação dos leucócitos (citometria de fluxo)
CD	Gravação dos dados

CALENDARIZAÇÃO

Duração

Global: 22 meses

Planeamento: 8 meses.

Execução: 9 meses + 3 meses.

Datas de início e conclusão

Global: Setembro de 2011 a Julho de 2013

Planeamento: Setembro de 2011 a Abril de 2012

Execução: Junho de 2012 – Fevereiro de 2013 - Maio de 2013

CRONOGRAMA GLOBAL DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

	ANO LECTIVO 2011/2012												ANO LECTIVO 2012/2013											
Mês	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	
Escolha da área	X																							
Integração na equipa		X																						
Escolha tema/ assunto		X																						
Identificação problemas		X	X																					
Formulação questões		X	X																					
Delineament o hipóteses		X	X																					
Definição objectivos			X																					
Revisão bibliográfica		X	X	X																				
Concepção estudo				X	X	X	X																	
Redacção proposta					X	X	X	X																
Submissão proposta								X	X															
Apresentaçã o proposta										X														
Execução projecto										X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Interpretação resultados																			X	X				
Relatório execução																					X			
Apresentaçã o resultados																						X		
Dissertação MIM																							X	

Cronograma de execução do projeto

Fase	Tarefa	ANO LECTIVO 2012/2013											
		06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05
Estudo de série (revisão casuística)	1	x	x	x									
Estudo laboratorial	2	x	x	x									
	3				x	x	x	x	x	x			
	4				x	x	x	x	x	x			
	5				x	x	x	x	x	x			
Análise/interpretação de resultados	6										x	x	
Relatório de execução	7												x

- ***Metas a atingir no âmbito do projeto (milestones)***

30 de Abril de 2012: Terminar a elaboração da proposta do projeto.

31 de Setembro de 2012: Concluir a revisão dos processos clínicos.

29 de Fevereiro de 2013: Concluir a colheita de sangue para estudo.

30 de Abril de 2013: Concluir a análise e interpretação dos resultados.

31 de Maio de 2013: Concluir o relatório de execução dos resultados.
- ***Entregas a efetuar no âmbito do projeto (deliverables)***

30 de Abril de 2012: Proposta de projeto.

31 de Setembro de 2012: Ficheiro excel com os dados da revisão casuística.

31 de Março de 2013: Ficheiro excel com os resultados laboratoriais.

30 de Abril de 2013: Resultados analisados e interpretados.

31 de Maio de 2013: Relatório de execução, a integrar na Dissertação de MIM.

INDICADORES DE PRODUÇÃO

Comunicações orais e posters

Apresentação oral da proposta nas JIIC (Junho / Julho de 2012)

Apresentação oral dos resultados nas JIIC (Junho / Julho 2013)

Outras possibilidades, a combinar futuramente com a Orientadora:

Apresentação oral da proposta em reunião de Serviço (Maio / Junho de 2012)

Apresentação oral dos resultados em reunião de Serviço (Maio / Junho de 2013)

Apresentação dos resultados em poster, em reunião científica (2013)

Trabalhos escritos

Proposta de projeto de investigação (Maio de 2012)

Dissertação de MIM (Julho de 2013)

Outras possibilidades, a combinar futuramente com a Orientadora:

Artigo para publicação em revista médica nacional ou internacional com arbitragem científica (2013)

QUESTÕES ÉTICAS

INFORMAÇÃO DOS PARTICIPANTES E CONSENTIMENTO INFORMADO

Informação dos participantes

A informação aos participantes será fornecida pela Dra. Paula Lago, na consulta de DII, que será também a pessoa responsável pela entrega do folheto informativo que segue em anexo.

Consentimento informado

A assinatura do consentimento informado (modelo em anexo) será solicitada pela Dra. Paula Lago na consulta de DII.

Outras questões com implicações éticas

- ***Riscos e benefícios***

Não existem riscos associados ao presente estudo. Os benefícios são indirectos e passam por permitir uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença e do seu tratamento.

- ***Confidencialidade e anonimização***

Garante-se a confidencialidade dos dados.

O registo dos dados em sistema informático (ficheiro Excel) com vista ao seu tratamento estatístico será feito após anonimização.

- ***Outros aspetos***

Os dados dos processos clínicos serão consultados pela aluna, com a supervisão e sob responsabilidade da orientadora, com de acordo com as normas do CHP.

As decisões terapêuticas serão tomadas de acordo com os protocolos em vigor no SGE e não serão modificadas pelo presente estudo.

Os doentes não necessitarão de deslocações extra ao hospital, uma vez que as colheitas de sangue serão realizadas nos dias das consultas de rotina.

As amostras de sangue não serão utilizadas para outros fins além daqueles que constituem os objetivos deste estudo (investigação do papel dos monócitos CD14⁺CD16⁺ na fisiopatologia da DII e na resposta ao tratamento).

PLANO FINANCEIRO

ORÇAMENTO

Não serão efetuadas consultas, internamentos, exames complementares de diagnóstico no CHP, especificamente no âmbito do projeto.

As análises a realizar são análises de investigação e não constam na tabela de preços do Sistema Nacional de Saúde, pelo que se procederá à compra dos reagentes necessários.

	Custo estimado (€)
Reagentes e material consumível de laboratório (anticorpos monoclonais, soluções para lavagem, lise e fixação de células, etc.)	2.000,00
Material administrativo (fotocópias, folhas, etc.)	00,00
Contratação de serviços	00,00
Pagamento de despesas aos participantes (deslocações)	00,00
Exames realizados no CHP (análises e outros meios complementares)	00,00
Taxas moderadoras de episódios (consultas, internamentos, etc.)	00,00
Taxas moderadoras de exames (análises, exames de imagem, etc.)	00,00
Impressão de poster para apresentação de resultados	50,00
Inscrição aluno em congresso médico	200,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
TOTAL	€2.300,00

FINANCIAMENTO

O estudo será financiado pelo ICBAS/UP, através de uma bolsa atribuída à DIIC.

GLOSSÁRIO

SIGLAS E ACRÓNIMOS

- CC, Central de Colheitas.
- CGE, Consulta de Gastrenterologia.
- CHP, Centro Hospitalar do Porto
- DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.
- DM, Departamento de Medicina.
- HSA, Hospital de Santo António.
- ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.
- JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica.
- MIM, Mestrado Integrado em Medicina.
- SGE, Serviço de Gastrenterologia.
- SHC, Serviço de Hematologia Clínica
- UP, Universidade do Porto.

TERMOS TÉCNICOS

- 5-ASA, Ácido 5-aminosalicílico
- 6-MMP, 6-Metil Mercaptopurina
- 6-MP, 6-Mercaptopurina
- AINE, Anti-inflamatórios não esteróides
- Anti-TNF α , Anticorpo anti-Factor de Necrose Tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)
- AZA, Azatioprina
- CsA, Ciclosporina A
- CU, Colite Ulcerosa
- DC, Doença de Crohn
- DHFR, Dihidrofolato Redutase
- DII, Doença Inflamatória Intestinal
- IL, Interleucinas
- LPS, Lipopolissacarídeo
- MDR1, Gene de resistência a múltiplas drogas tipo 1 (*Multiple Drug Resistance*)
- MTX, Metotrexato
- TNF α , Factor de Necrose Tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)
- TPMT, Tiopurina Metil-transferase
- γ -INF, Interferão Gama

ANEXOS

Lista de anexos

- Folha de rosto de estudo de investigação

- Pedidos de autorização (Presidente do Conselho de Administração do CHP, Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP, Directora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP).
- Termos de responsabilidade (Aluno, Orientador, Regente da DIIC)
- Autorizações locais (Departamentos e Serviços do CHP envolvidos no projecto)

- Carta dirigida à Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP a solicitar dispensa de consentimento informado (1ª fase do estudo).
- Termo de consentimento informado (2ª fase do estudo).
- Folheto informativo para os participantes (2ª fase do estudo).

- Formulário de recolha de dados clínicos.

Lista de documentos para

TRABALHOS ACADÉMICOS DE INVESTIGAÇÃO (que conferem grau)

	Data de entrega (ou NA, não aplicável)	Secretariado (Assinatura)
--	---	------------------------------

Documentos comprovativos

Inscrição em Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento	NA	
---	----	--

Cartas do Aluno, a solicitar autorização institucional

Presidente do Conselho de Administração	X	
Presidente da CES	X	
Director do DEFI	X	

Termos de responsabilidade de Alunos e Orientadores

Aluno	X	
Orientador do Projecto	X	
Supervisor do Projecto, Responsável pela DIIC	X	

Termos de autorização local (no CHP)

Responsáveis por Unidades / Gabinetes / Sectores	X	
Directores de Serviço	X	
Directores / Conselhos de Gestão de Departamentos	X	

Proposta

Folha de Rosto do Estudo de Investigação	X	
Proposta de Trabalho Académico de Investigação	X	

Anexos

Curriculum Vitae do Aluno	NA	
Termo de Consentimento Informado	X	
Folheto com informação para dar aos Participantes	X	
Carta a solicitar dispensa Consentimento Informado	X (1ª fase estudo)	
Inquéritos / questionários ou guiões de entrevistas*	NA	
Formulário para recolha de dados clínicos	X	
Outros documentos	NA	

SECRETARIADO:

Data

____/____/____

Assinatura

FOLHA DE ROSTO DO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO

TÍTULO

IMUNOSSUPRESSORES NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL: Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

CLASSIFICAÇÃO

Trabalho Académico de Investigação X (Mestrado Integrado em Medicina)
Projeto de Investigação X

VERSÃO

Novo X

CALENDARIZAÇÃO

Data de início: 09/2011 (execução: 06/2012)
Data de conclusão: 06/2013 (execução: 04/2013)
Prazo a cumprir: 06/2012

ALUNOS E ORIENTADORES

Aluno

Rita Ribeiro Dias, aluna do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto; e-mail: rita.ribeiro.d@gmail.com; Telemóvel: 911542805

Orientador do projeto

Paula Lago, médica, especialista em Gastreenterologia do Serviço de Gastreenterologia do Centro Hospitalar do Porto; e-mail: paulalago@netcabo.pt; Telemóvel: 962860392.

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Margarida Lima, médica especialista em Imunohemoterapia do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto, responsável pelo Laboratório de Citometria; Professora Auxiliar Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica; e-mail: director.defi@hgsa.min-saude.pt; mmc.lima@clix.pt; Telemóvel: 966327115.

OUTROS INVESTIGADORES

Investigadores

João Rodrigues, Técnico Superior de Saúde do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto, a exercer funções na Unidade de Biologia Molecular e no Laboratório de Citometria; e-mail: joaodrigues@gmail.com; Telemóvel: 966425103

PROMOTOR O próprio X

INSTITUIÇÕES E SERVIÇOS

Unidades, Departamentos e Serviço do CHP

CHP – Serviço de Gastroenterologia, Consulta de Gastroenterologia (proponente)
CHP – Serviço de Hematologia Clínica, Laboratório de Citometria

Outras Instituições intervenientes

NA

CARACTERÍSTICAS do estudo

Alvo do estudo

Humanos X

Natureza do estudo

Clínico X

Terapêutico X

Laboratorial X

Países / Instituições envolvidos

Nacional X

Institucional X

Características do estudo (desenho)

1ª fase: Observacional X

Revisão casuística Descritivo X

2ª fase: Observacional X

Estudo laboratorial Analítico X

Longitudinal X

(Prospetivo)

Participantes

Existência de grupo controlo: Não X

Seleção dos participantes: Não aleatória X

Outros aspetos relevantes para a apreciação do estudo:

Participação de grupos vulneráveis Não X

Convocação de doentes / participantes Não X

Consentimento informado Sim X (Segunda fase do estudo)

Inquéritos / questionários Não X

Entrevistas Não X

Colheita de produtos biológicos Sim X (No CHP)

Armazenamento de produtos biológicos Não X

Criação de bancos de produtos biológicos Não X

Realização de exames / análises Sim X (Análises de investigação; no CHP)

Realização de estudos genéticos Não X

Recolha de dados Sim X (Dados clínicos e laboratoriais)

Criação de bases de dados Sim X (Ficheiro Excel anonimizado)

Saída para outras instituições Não X

ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO

Orçamento total: 2.300,00 euros Contrato financeiro em anexo: Não X

Financiamento:

Interno (CHP) 0,00 Euros Externo 2.300,00 euros

Entidades financiadoras: ICBAS / DIIC

INDICADORES

Apresentação dos resultados nas Jornadas de Iniciação à Investigação;
Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Data:

Assinatura do proponente (Aluno):

PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

Título do trabalho: Imunossupressores na Doença Inflamatória Intestinal: Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

Rita Ribeiro Dias, aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP.

Presidente do Conselho de Administração do CHP

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do CHP

Rita Ribeiro Dias, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data	Assinatura
___/___/___	_____

Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Rita Ribeiro Dias, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data	Assinatura
___/___/___	_____

Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Exma. Senhora Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Rita Ribeiro Dias, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data	Assinatura
___/___/___	_____

TERMOS DE RESPONSABILIDADE

Título do trabalho: Imunossupressores na Doença Inflamatória Intestinal: Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

Rita Ribeiro Dias, aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP.

Aluno

Na qualidade de Aluna, comprometo-me a executar o Trabalho Académico de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados, respeitando os princípios éticos e deontológicos e as normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Rita Ribeiro Dias	___/___/___	_____

Orientador do projeto

Na qualidade de Orientadora, solicito autorização do Conselho de Administração para que a Aluna acima referido possa desenvolver no CHP o seu Trabalho de Investigação. Informo que me comprometo a prestar a orientação necessária para uma boa execução do mesmo e a acompanhar a Aluna nas diferentes fases da sua realização, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Paula Lago	___/___/___	_____
Instituição	Departamento	Serviço / Sector
CHP	Medicina	Gastroenterologia

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Na qualidade de Docente Responsável pela DIIC / Supervisor do Aluno no CHP, comprometo-me a prestar a orientação necessária para uma boa execução do Trabalho de Investigação, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados. Mais declaro que acompanharei a Aluna, responsabilizando-me por supervisionar a execução do trabalho no CHP, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Margarida Lima	___/___/___	_____
Departamento: DEFI		

TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL

Título do trabalho: Imunossupressores na Doença Inflamatória Intestinal: Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

Rita Ribeiro Dias, aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP.

Responsáveis por Unidades, Gabinetes ou Sectores

Na qualidade de Responsável pela Unidade / Gabinete / Sector, dou parecer favorável à execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Unidade / Gabinete / Sector	Nome do Responsável	Data	Assinatura
Laboratório de Citometria	Margarida Lima	___/___/___	_____

Diretores de Serviço

Na qualidade de Diretor de Serviço, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Serviço	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Gastroenterologia	Isabel Pedroto	___/___/___	_____
Hematologia Clínica	Jorge Coutinho	___/___/___	_____

Diretores / Conselhos de Gestão de Departamento

Na qualidade de Diretor do Departamento, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Departamento	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Medicina	José Lopes Gomes	___/___/___	_____

CONSENTIMENTO INFORMADO

Pedido de dispensa de Consentimento Informado

Para a 1ª fase (Revisão casuística) do estudo de
investigação: “IMUNOSSUPRESSORES NA DOENÇA INFLAMATÓRIA
INTESTINAL: Análise da Casuística do Centro Hospitalar do Porto e Contributo
para o Esclarecimento da Fisiopatologia da Doença”

Exma. Sra. Presidente da Comissão de Ética, do CHP

Eu, Rita Ribeiro Dias, na qualidade de Aluna, venho por este meio pedir dispensa do Consentimento Informado para a primeira parte do Trabalho Académico de Investigação acima mencionado (Revisão Casuística), em que serão caracterizados, de forma retrospectiva, os doentes com Doença Inflammatory Intestinal, medicados com Imunossuppressores, que frequentam ou frequentaram a Consulta de Gastroenterologia do CHP, através da consulta dos processos clínicos.

Para os devidos efeitos informo que não há riscos, incómodos ou despesas para os doentes ou seus familiares e que a consulta dos processos clínicos decorrerá de acordo com as normas aprovadas no CHP, sendo realizada com a supervisão e sob a responsabilidade da minha orientadora.

Informo ainda que os formulários de recolha dos dados clínicos, onde consta a identificação dos doentes, ficarão à guarda da minha orientadora e que a informação a processar no âmbito do trabalho de investigação será anonimizada.

Aluno	Data	Assinatura
Rita Ribeiro Dias	____/____/____	_____

Termo de consentimento informado

Título do trabalho: Imunossupressores na Doença Inflamatória Intestinal: Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

Eu, _____, abaixo-assinado, fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a estudar e caracterizar a utilização de imunossupressores no tratamento da Doença Inflamatória Intestinal e contribuir para uma melhor compreensão acerca da doença.

Sei que neste estudo está prevista a colheita de sangue para a realização de análises tendo-me sido explicado em que consistem.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efetuada a colheita de duas amostras de sangue, uma antes e outra após o início do tratamento, para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo _____

Data
____/____/____

Assinatura

Nome do Médico Responsável _____

Data
____/____/____

Assinatura

Folheto informativo para os participantes

Título do trabalho: Imunossupressores na Doença Inflamatória Intestinal: Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

A Doença de Crohn e a Colite Ulcerosa são doenças inflamatórias intestinais, para as quais, não existe ainda cura, apesar de, nos últimos anos, muito se ter descoberto sobre elas e o sobre o seu tratamento. Como tal, é importante que continuem a ser estudadas, de forma a permitir a estes doentes, uma qualidade de vida, cada vez melhor.

De entre os vários tratamentos existentes, os imunossupressores são bastante úteis, sobretudo em formas mais graves da doença. Estes medicamentos ajudam a combater a resposta exagerada das células de defesa do organismo, contribuindo para a inibição da produção de substâncias inflamatórias e do processo inflamatório ao nível do aparelho gastrointestinal.

Os monócitos são um tipo importante de células de defesa do organismo. Recentemente foi descoberto que uma população específica de monócitos produz substâncias que contribuem para a inflamação intestinal na Colite Ulcerosa e na Doença de Crohn. Com este estudo pretende-se, investigar se os imunossupressores (Azatioprina), além dos efeitos já referidos, contribuem também para a diminuição da quantidade destas células, nos doentes com Doença Inflamatória Intestinal.

Este estudo não acarreta riscos para os participantes e tem o benefício de contribuir para a obtenção de informações importantes e potencialmente úteis para a compreensão da sua doença e tratamento. Cada participante será submetido a duas colheitas de sangue, uma a realizar antes de iniciar o tratamento, e outra cerca de 3 meses depois. Este sangue será enviado para análise, com o objectivo de estudar os efeitos do tratamento nas células acima referidas.

Agradeço a disponibilidade e o contributo para o estudo.

A aluna,

Rita Ribeiro Dias

FORMULÁRIO DE RECOLHA DE DADOS

Título do trabalho: Imunossupressores na Doença Inflamatória Intestinal: Análise da casuística do Centro Hospitalar do Porto e contributo para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

Os dados que se pretende recolher dos processos clínicos, são os seguintes:

- Sexo
- Data de nascimento
- Data de início das manifestações da DII
- Data de diagnóstico da DII
- Tipo de DII
- Classificação da DII
 - L/E (Classificação DII)
 - B (Classificação DII)
- Reclassificação da DII
 - L/E (Reclassificação)
 - B (Reclassificação)
- Manifestações da DII
 - Manifestações intestinais
 - Doença perianal
 - Manifestações extraintestinais
- Autoanticorpos séricos
 - ANCA (*anti-neutrophil cytoplasm antibodies*)
 - ASCA (*anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies*)
- Tratamentos
 - Antibióticos
 - Derivados do ácido 5-aminosalicílico
 - Corticosteróides
 - Imunossupressores
 - Tipo de imunossupressor
 - Data de início do tratamento com imunossupressor
 - Indicação para o tratamento com imunossupressor
 - Resposta ao imunossupressor
 - Paragem/substituição do imunossupressor
 - Motivo da paragem/substituição
 - Reações adversas
 - Anticorpos monoclonais
 - Cirurgia 1/2/3
 - Cirurgia anal
- História pessoal
 - Hábitos tabágicos
 - Doenças associadas
 - Doenças autoimunes; neoplasias
- História familiar
 - DII
 - Outras doenças:
 - Doenças autoimunes; neoplasias

RELATÓRIO DE EXECUÇÃO DO PROJETO

METODOLOGIA

1ª Fase: Caracterização da utilização de imunossupressores nos pacientes com DII

Recolha de Dados: A recolha de dados foi efetuada numa base de dados e após parecer favorável da Comissão de Ética do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António. Esta base de dados incluiu informações recolhidas entre Julho e Dezembro de 2012, relativas aos doentes com Doença Inflammatory Intestinal, seguidos no serviço de Gastroenterologia do Centro Hospitalar do Porto.

Parâmetros Avaliados: Todos os dados foram recolhidos retrospectivamente, com recurso a consulta do processo clínico. Foi registada informação relativa a sexo, idade, idade de início dos sintomas e do diagnóstico da doença, tipo, extensão, localização, e comportamento da DII, presença de doença perianal, coexistência de doença autoimune e estados de imunossupressão, e manifestações extraintestinais associadas. Foram ainda utilizados dados referente à utilização de fármacos imunossupressores, nomeadamente, tipo, data de início, indicação, resposta, paragem ou substituição, data e motivo da paragem ou substituição e reações adversas ao respetivo imunossupressor.

Os tipos de imunossupressores considerados foram a azatioprina e a 6-mercaptopurina, agrupados num único grupo correspondente como tiopurinas, e o metotrexato. A maioria dos doentes medicados com tiopurinas fez a azatioprina (99%). As indicações terapêuticas para imunossupressão foram agrupadas em 6 grupos: doença corticodependente, doença corticorresistente, coexistência de doença perianal, presença de manifestações extraintestinais, doença de mau prognóstico e profilaxia pós-cirúrgica. Definiu-se corticodependência como a impossibilidade em reduzir a prednisolona para doses <10 mg/kg, 3 meses após o seu início ou recidiva 3 meses após a sua suspensão, e corticorresistência como impossibilidade em induzir a remissão com prednisolona na dose 0.75-1 mg/kg, durante 1 a 3 semanas. Como factores de mau prognóstico foram incluídos a doença penetrante, a localização no tracto GI superior, a idade de apresentação precoce (< 40 anos), a necessidade de corticoterapia no diagnóstico e a necessidade hospitalização por agudização ou complicação e/ou sintomas crónicos ativos durante mais de 12 meses.

Foram considerados 11 tipos de reações adversas: anemia, leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, alteração das provas de função hepática, pancreatite aguda, intolerância gastrointestinal, infeção grave, hepatite colestática, síndrome mielodisplásico, reação de hipersensibilidade.

A leucopenia foi definida pela contagem total de leucócitos < 4.000 células/mm³ e leucopenia grave quando os mesmos estivessem abaixo de 2.000 células/mm³; classificou-se trombocitopenia como a contagem de plaquetas < 130.000 células/mm³, neutropenia como a contagem de neutrófilos < 1.000 células/mm³ e linfopenia a contagem de linfócitos < 800 células/mm³. Considerou-se alterações das provas de função hepática quando houve aumento das aminotransferases acima de duas vezes o limite superior da normalidade, qualquer que fosse a ocasião da ocorrência de um destes eventos durante o tratamento com imunossupressor.

Os motivos para a paragem do imunossupressor foram separados em 5 grupos: reação adversa, ausência de resposta, remissão prolongada, escalada para biológico, e outro.

A resposta à imunossupressão foi avaliada nos indivíduos que mantiveram o tratamento durante pelo menos 6 meses e cuja indicação para imunossupressão foi a corticodependência ou corticorresistência, doença perianal ou manifestações extraintestinais. Quando a indicação para imunossupressão foi a corticodependência ou a corticorresistência, a resposta foi considerada completa quando a corticoterapia foi suspensa, e os pacientes se mantiveram sem necessidade de corticoide por pelo menos, dois anos; parcial se houve resposta clínica, mas necessidade de um ou mais ciclos de corticosteroides num período de pelo menos 2 anos; e ausente, se não houve melhoria clínica. Para os indivíduos que iniciaram imunossupressão por doença perianal fistulizante, a resposta foi classificada como completa, perante paragem total de supuração por um período igual ou superior a 2 anos; parcial, se houve redução da supuração mas necessidade de escalada terapêutica; e ausente se não houve melhoria clínica. Nos indivíduos que mantiveram o tratamento com imunossupressor por um período de tempo inferior a seis meses, a resposta foi classificada como não avaliável.

Os pacientes cuja indicação para imunossupressão foi a profilaxia pós cirúrgica, após ressecção ileocólica, foram divididos em dois grupos: um correspondente àqueles que iniciaram imunossupressor até 3 meses após a cirurgia, e um segundo grupo relativo aos que iniciaram imunossupressor aquando da recidiva endoscópica.

Análise Estatística: A análise descritiva foi realizada utilizando-se o programa *SPSS 20.0 PASW* (Statistical Package for the Social Sciences), e os dados apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão para as variáveis contínuas e frequência absoluta (percentagem) para as variáveis categóricas.

2ª Fase: Quantificação e Caracterização dos Monócitos por Citometria de Fluxo

Amostras: Os estudos imunofenotípicos para quantificação e caracterização dos monócitos foram feitos em sangue periférico colhido com anticoagulante (EDTA-K3),

As amostras de sangue foram colhidas entre Agosto de 2012 e Maio de 2013 em pacientes selecionados de forma não aleatória, por conveniência. Foram incluídos nesta seleção, de forma consecutiva, os pacientes com diagnóstico de DII de acordo com os critérios de Lennard-Jonnes (141, 142), que cumprissem os seguintes critérios: ter idade igual ou superior a 18 anos; ser seguido na CGE; ter necessidade de iniciar tratamento com imunossupressor entre Julho e Janeiro de 2012; nunca ter realizado tratamento com imunossupressor ou ter feito a sua suspensão há mais de 12 meses; assinar de forma livre e esclarecida o consentimento informado.

Para constituição do grupo de controlo, foram também colhidas amostras de sangue, em indivíduos saudáveis, dadores benévolos de sangue, selecionados de forma aleatória e emparelhados por idade e sexo, com os doentes.

Foi realizada uma primeira colheita de sangue periférico, nos controlos, e nos pacientes com DII, tendo sido este momento, designado por Tempo 0. Posteriormente foi realizada uma segunda colheita de sangue, apenas nos doentes com DII, durante o tratamento com azatioprina, tendo sido este momento designado por Tempo 1.

Imunofenotipagem: Foi usada uma técnica de imunofluorescência direta para a imunomarcação das células. De forma resumida, 100 µL de sangue contendo 0.5 to 2×10^6 leucócitos / ml, foram incubados durante 15 minutos, à temperatura ambiente e no escuro, na presença de concentrações saturantes de anticorpos monoclonais específicos para diferentes antígenos (CD14, CD16 e CD45), conjugados com diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e complexo peridina - proteína clorófila (PerCP). De seguida, a lise dos eritrócitos e a fixação dos leucócitos foram feitas adicionando 2 ml de FACS lysing solution [Becton/Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA] previamente diluída a 1/10 (v/v) em água destilada e incubando as células durante 10 minutos nas mesmas condições. Finalmente, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS, phosphate buffered saline), por centrifugação a 540g, e suspendidas em PBS.

Leitura das amostras: Para a leitura das amostras foi usado um citómetro de fluxo modelo FACScanto II (BD) equipado com 3 lasers: um laser azul (488 nm, 20 mW) e um laser vermelho (633-nm, hélio-néon, 17 mW), arrefecidos a ar, e um laser violeta (405 nm, 30 mW). A aquisição das amostras foi feita com o programa BD FACSDiva™ (BD). Foram

adquiridos no mínimo 2×10^5 eventos em cada amostra, que foram gravados como ficheiro de dados de tipo FCS3.0.

Análise dos dados: Os dados foram analisados com o programa Infinicyte (Cytognos, Espanha). Sumariamente, os monócitos foram identificados com base na expressão de CD45 e de CD14. De seguida, e após seleção dos monócitos, foram identificadas as duas subpopulações principais, com base na expressão de CD14 e de CD16: monócitos CD14+CD16- (intensidade forte de expressão de CD14 e ausência de expressão de CD16) e monócitos CD14+CD16+ (expressão de CD14 e expressão de CD16). Procedeu-se à avaliação dos seguintes parâmetros: percentagem de monócitos, no total dos leucócitos; percentagem de monócitos CD14+CD16- e CD14+CD16+, no total dos monócitos; densidade antigénica de CD14 e de CD16 em cada uma das subpopulações, avaliada pelas correspondentes intensidades médias de fluorescência (IMF); heterogeneidade de expressão, avaliada pelo respetivo coeficiente de variação (CV); tamanho e complexidade dos monócitos, avaliados pelas características de dispersão da luz (FSC, *forward scatter* e SSC, *side scatter*, respetivamente).

Análise Estatística: A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS 20.0 PASW (Statistical Package for the Social Sciences). As características clínicas e demográficas das amostras foram avaliadas por estatística descritiva. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a análise transversal e o de Wilcoxon para a análise longitudinal. Foi considerada significância estatística para $p < 0,05$ com um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

1ª Fase: Caracterização da utilização de imunossupressores nos pacientes com DII

Na consulta de DII do Serviço de Gastroenterologia do CHP, eram acompanhados, até 31 de Dezembro de 2012, 914 doentes com DII, dos quais 385, faziam ou fizeram em algum momento, tratamento com imunossupressor convencional, nomeadamente, tiopurina ou metotrexato. A **tabela 1** descreve as principais características clínicas e demográficas destes pacientes.

Tabela 1 - Caracterização dos doentes com DII seguidos na consulta de gastroenterologia do CHP.

	DC	CU	DIICNC	CI	Total
Número de doentes	546	339	28	1	914
Género					
Feminino	312 (57.1%)	183 (54.0%)	18 (64.3%)	1 (100.0%)	514 (56.2%)
Masculino	234 (42.8%)	156 (46.0%)	10 (35.7%)	0 (0.0%)	400 (43.8%)
Doença Perianal	151 (27.7%)	0 (0.0%)	3 (10.7%)	0 (0.0%)	154 (16.8%)
MEI					
Eritema Nodoso	21 (18.6%)	1 (2.9%)	1 (16.7%)	0 (0.0%)	23 (14.9%)
Pioderma Gangrenoso	7 (6.2%)	1 (2.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (5.2%)
Articulares Periféricas	59 (52.2%)	15 (42.9%)	2 (33.3%)	0 (0.0%)	76 (49.4%)
Articulares Centrais	23 (20.4%)	13 (37.1%)	2 (33.3%)	0 (0.0%)	38 (24.7%)
Oculares	15 (13.3%)	1 (2.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	16 (10.4%)
Estomatite Aftosa	18 (15.9%)	3 (8.6%)	2 (33.3%)	0 (0.0%)	23 (14.9%)
CEP	2 (1.8%)	6 (17.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (5.2%)
HAI	5 (4.4%)	3 (8.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (5.2%)
Estados de Imunossupressão*	7 (1.3%)	7 (2.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	14 (1.5%)
Doenças Autoimunes	11 (2.0%)	7 (2.1%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)	19 (2.1%)
Necessidade de cirurgia Intestinal	240 (44.0%)	15 (4.4%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	258 (28.0%)

Abreviaturas: DII, Doença Inflamatória Intestinal; CHP, Centro Hospitalar do Porto; DC, Doença de Crohn; CU, Colite Ulcerosa; DIICNC, Doença inflamatória intestinal do colón não classificada; CI, Colite inespecífica; MEI, manifestações extraintestinais; CEP, Colangite esclerosante primária; HAI, Hepatite autoimune.

Os valores estão apresentados sob a forma de frequência absoluta (percentagem).

*Inclui: imunossupressão pós transplante-renal, imunossupressão pós transplante hepático, imunossupressão em doente HIV+, imunossupressão em doente HCV+, imunossupressão em doente HBV+ e quimioterapia por neoplasia

A idade média de diagnóstico da DC foi de 33.3 (\pm 0.6) anos e para a CU foi de 39.3 (\pm 0.8) anos, com uma diferença de 6 anos entre os dois tipos de DII.

Os dois imunossuppressores convencionais estudados foram a tiopurina (azatioprina e 6-MP) e o MTX. A forma de utilização destes fármacos foi dividida em: primeiro imunossupressor e segundo imunossupressor. No grupo do primeiro imunossupressor foram incluídos os doentes que nunca tinham sido expostos a terapêutica imunossupressora convencional, e no grupo do segundo imunossupressor foram incluídos os doentes que haviam sido expostos ao 1º imunossupressor, mas necessitaram de o substituir por um imunossupressor de classe diferente.

O intervalo de tempo decorrido entre o diagnóstico da doença e o início do tratamento com o primeiro imunossupressor, foi, em média, de 5.4 (\pm 6.3) meses para a DC e de 4.2 (\pm 4.8) meses para a CU, com uma diferença de 1.2 meses entre ambas as condições. O tempo mínimo decorrido foi de 0 meses nas duas doenças, e o máximo foi de 38 meses para a DC e 20 meses para a CU.

Para os pacientes que já suspenderam ou substituíram o primeiro imunossupressor, a duração média do tratamento foi de 32.3 (\pm 35.5) meses para a DC e de 18.2 (\pm 32.3) meses para a CU. Para aqueles que ainda mantêm esta terapêutica, a duração média do tratamento com o primeiro imunossupressor é de 52.7 (\pm 44.9) meses para a DC e de 56.2 (\pm 56.1) meses para a CU.

A duração do tratamento com o segundo imunossupressor foi em média de 27.4 (\pm 27.4) meses para a DC, com um mínimo de 2 e um máximo de 155 meses. Para o único paciente com CU que fez tratamento com o segundo imunossupressor, a duração do tratamento foi de 122 meses.

A **tabela 2** descreve a utilização de fármacos imunossuppressores nas diferentes DII's, de acordo com o número de vezes e o fármaco utilizado.

Tabela 2 - Utilização de imunossuppressores na DII

	DC	CU	DIICNC	CI	TOTAL
1º IM	329 (60.3%)	52 (15.3%)	4 (14.3%)	0 (0.0%)	385 (42.1%)
Tiopurina	321 (97.6%)	51 (98.1%)	4 (100.0%)	0 (0.0%)	376 (97.7%)
Metotrexato	8 (2.4%)	1 (1.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	9 (2.3%)
2º IM					
Tiopurina	1 (2.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (2.5%)
Metotrexato	37 (97.4%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	39 (97.5%)
Terapêutica Combinada com BIO*	88 (16.1%)	12 (3.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	100 (10.9%)

Abreviaturas: DII, Doença Inflamatória Intestinal; DC, Doença de Crohn; CU, Colite Ulcerosa; DIICNC, Doença inflamatória intestinal do colón não classificada; CI, Colite inespecífica, BIO, fármaco biológico (anti-TNF α). Os valores estão apresentados sob a forma de: frequência absoluta (percentagem).

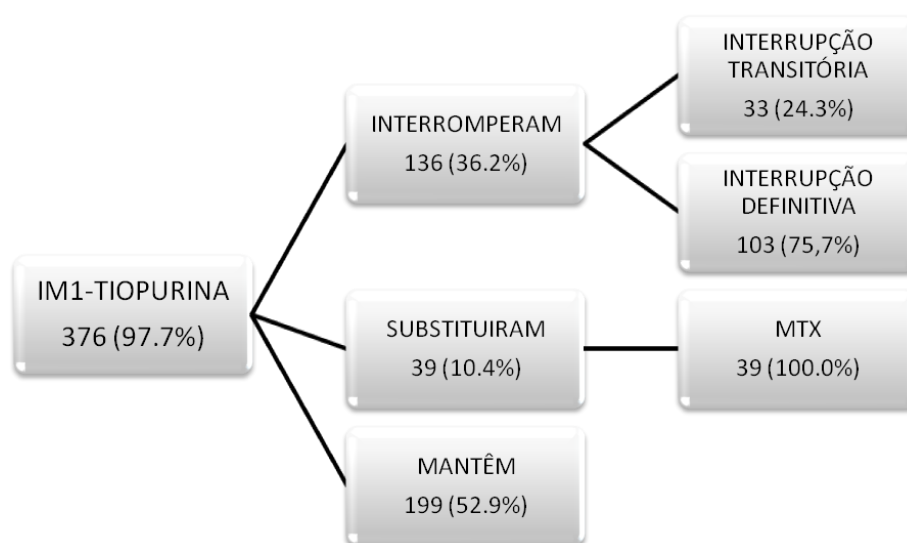
*O fármaco biológico utilizado nestes doentes foi um agente anti-TNF α .

Dos 914 pacientes em estudo, um total de 385 (42.1%) pacientes fizeram o primeiro imunossupressor. Verificou-se que a utilização do primeiro imunossupressor foi bastante mais frequente nos doentes com DC (60.3%), em comparação com os doentes com CU (15.3%). O segundo imunossupressor foi utilizado em 10.4% dos pacientes em estudo, tendo-se constatado que tal como para o primeiro imunossupressor, os indivíduos com DC foram os que mais o utilizaram (11.6%), comparativamente aos que tinham CU (1.9%).

Como primeiro imunossupressor, os fármacos utilizados com mais frequência foram as tiopurinas, em 97.7% dos pacientes que necessitaram de imunossupressão. Para a utilização do segundo fármaco imunossupressor, esta relação inverteu-se, com o metotrexato a ser utilizado em 97.5% dos pacientes.

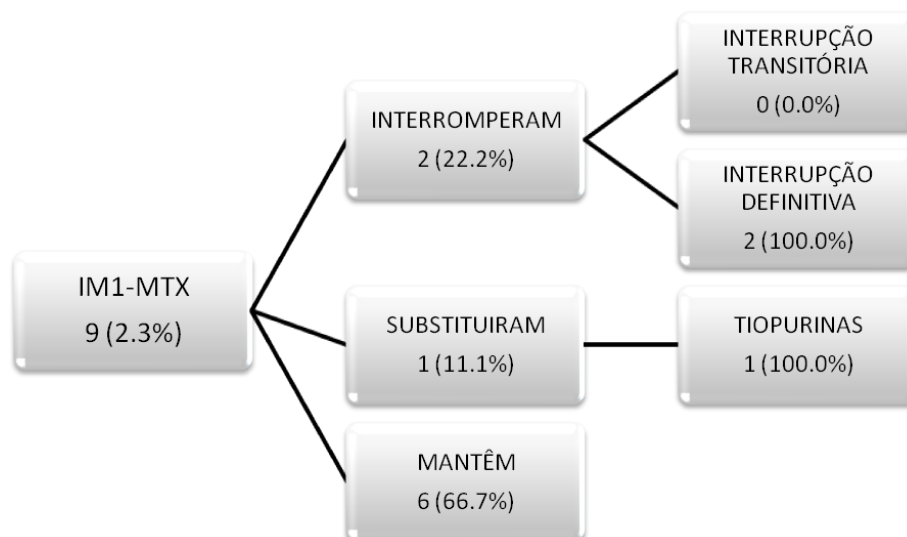
As **figuras 1 e 2** ilustram a evolução do tratamento com o 1º imunossupressor, de acordo com o fármaco utilizado.

Figura 1 - Utilização das tiopurinas como primeiro imunossupressor



Abreviaturas: IM1, Imunossupressor 1; MTX, Metotrexato
Os valores estão apresentados sob a forma de: frequência absoluta (percentagem).

Figura 2 - Utilização do MTX como primeiro imunossupressor



Abreviaturas: IM1, Imunossupressor 1; MTX, Metotrexato
Os valores estão apresentados sob a forma de: frequência absoluta (percentagem).

Tabela 3 - Tratamento com imunossupressor e a classificação de Montreal da DII

CU – Extensão	Tratamento com Imunossupressor	
	Sim	Não
E1	1 (1.1%)	0 (0.0%)
E2	21 (13.5%)	134 (86.5%)
E3	30 (31.6%)	65 (68.4%)
DC - Localização		
L1	98 (53.8%)	84 (46.2%)
L2	53 (46.1%)	62 (53.9%)
L3	135 (70.7%)	56 (29.3%)
L4*	43 (74.1%)	15 (25.9%)
DC - Comportamento		
B1	139 (48.4%)	148 (51.6%)
B2	101 (70.1%)	43 (29.9%)
B3	89 (77.4%)	26 (22.6%)
DC – Idade		
A1	24 (75.0%)	8 (25.0%)
A2	241 (64.6%)	132 (35.4%)
A3	64 (45.4%)	77 (54.6%)
Doença Perianal	114 (75.5%)	37 (24.5%)

Abreviaturas: DII, Doença Inflamatória Intestinal; CU, Colite Ulcerosa; DC, Doença de Crohn.

Os valores estão apresentados sob a forma de frequência absoluta (percentagem).

*Inclui qualquer L (L1 ou L2 ou L3) + L4.

A **tabela 3** caracteriza a necessidade de utilização de imunossupressores, de acordo a idade de diagnóstico, localização e comportamento da doença para a DC e de acordo com a extensão para a CU. Nos pacientes com DC, verificou-se uma maior utilização de imunossupressores nos casos de doença ileocólica e atingimento do tubo digestivo proximal, na doença de comportamento penetrante e estenosante, E nos pacientes diagnosticados mais precocemente. Nos pacientes com CU, verificou-se que a necessidade de utilização de fármacos imunossupressores foi mais frequente nos casos de doença extensa. A utilização de imunossupressores foi também consideravelmente mais frequente nos doentes com DC e manifestações perianais.

Tabela 4 - Indicação para imunossupressão, de acordo com o fármaco utilizado.

Indicação	1º Imunossupressor		
	Tiopurina*	MTX	Total
Gravidade Doença	118 (31.4%)	2 (1.7%)	120 (31.2%)
Corticodependência	98 (26.1%)	1 (1.0%)	99 (25.7%)
Corticorresistência	18 (4.8%)	0 (0.0%)	18 (4.7%)
Profilaxia Pós-Cx	80 (21.3%)	0 (0.0%)	80 (20.8%)
Doença Perianal	48 (12.8%)	0 (0.0%)	48 (12.5%)
MEI	11 (2.9%)	6 (66.7%)	17 (4.4%)

Abreviaturas: MTX, Metotrexato; Pós-Cx, Pós-cirúrgica; MEI, manifestações extra- intestinais.

Os valores estão apresentados sob a forma de: frequência absoluta (percentagem).

*Para 3 pacientes que fizeram tiopurina a indicação para o tratamento era desconhecida.

Comparando as duas classes de fármacos utilizadas, verifica-se que dos pacientes que fizeram tiopurinas como primeiro imunossupressor, as indicações mais frequentes para o tratamento foram a gravidade da doença, a corticodependência e a profilaxia pós-cirúrgica. Dos pacientes tratado com MTX, a principal indicação para o imunossupressor foi a existência de manifestações extraintestinais, nomeadamente a artropatia.

Dos pacientes cuja indicação para imunossupressor foi a profilaxia pós cirúrgica, 27.8% iniciou o imunossupressor até 2 meses após a cirurgia e 65.8% iniciou-o após evidência endoscópica de recidiva. Para 6.3% destes pacientes não existia informação reportada.

A resposta ao 1º imunossupressor (completa, parcial ou ausente) foi analisada para as indicações corticodependência, corticorresistência, doença perianal e MEI (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Resposta ao fármaco imunossupressor de acordo com a indicação para o tratamento

Resposta ao IM**	Indicação para Imunossupressor				
	Corticodependência	Corticorresistência	Perianal	MEI	Total
Completa	31 (36.5%)	7 (46.7%)	12 (26.7%)	5 (33.3%)	55 (34.4%)
Parcial	41 (48.2%)	8 (53.3%)	26 (57.8%)	8 (53.3%)	83 (51.9%)
Ausente	13 (15.7%)	0 (0.0%)	7 (15.6%)	2 (13.3%)	22 (13.8%)

Abreviaturas: IM, Imunossupressor; MEI, Manifestações Extraintestinais.

Os valores estão apresentados sob a forma de: frequência absoluta (percentagem).

*Não estão contempladas as indicações “gravidade” e “profilaxia pós-cirúrgica” por ausência de dados que permitam avaliar a resposta ao imunossupressor nestas condições.

**Para um total de 24 indivíduos, não foi possível avaliar a resposta ao imunossupressor por ainda não terem completado um mínimo de 6 meses com o respetivo fármaco.

Para todas as indicações analisadas, a resposta ao tratamento mais frequente foi a resposta parcial, verificada em mais de metade dos pacientes com indicação para imunossupressor por corticorresistência, doença perianal e MEI, e quase em metade dos pacientes com corticodependência como indicação. Dos pacientes que iniciaram imunossupressor por corticorresistência, nenhum apresentou ausência de resposta ao tratamento, e esta foi também a resposta menos frequente para as restantes indicações.

A ocorrência de reações adversas verificou-se em 168 (43.6%) dos pacientes sob tratamento com o 1º imunossupressor e em 10 (25.0%) dos pacientes em tratamento com o 2º imunossupressor. Alguns indivíduos apresentaram mais do que um efeito adverso.

Tabela 6 - Tipo de reação adversa com o 1º e 2º IM utilizados, na totalidade dos doentes que apresentaram reações adversas.

Reação Adversa	1º Imunossupressor		
	Tiopurina	MTX	Total
Anemia	16 (9.8%)	1 (25.0%)	17 (10.1%)
Leucopenia	59 (36.0%)	0 (0.0%)	59 (35.1%)
Alteração PFH	26 (15.9%)	2 (50.0%)	28 (16.0%)
Intolerância GI	25 (15.2%)	1 (25.0%)	26 (15.5%)
Pancreatite aguda	21 (12.8%)	0 (0.0%)	21 (12.5%)
Trombocitopenia	2 (1.2%)	0 (0.0%)	2 (1.2%)
Reação de Hipersensibilidade*	12 (7.3%)	0 (0.0%)	12 (7.1%)
Pancitopenia	16 (9.8%)	0 (0.0%)	16 (9.5%)
Infeção Grave	5 (3.0%)	0 (0.0%)	5 (3.0%)
Síndrome Mielodisplásico	1 (0.6%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
Hepatite Colestática	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1 (0,6%)
	2º Imunossupressor		
	Tiopurina	MTX	Total
Anemia	0 (0.0%)	1 (2.6%)	1 (2.5%)
Leucopenia	0 (0.0%)	2 (5.1%)	2 (5.0%)
Alteração PFH	0 (0.0%)	3 (7.7%)	3 (7.5%)
Intolerância GI	0 (0.0%)	4 (10.3%)	4 (10.0%)

Abreviaturas: IM, Imunossupressor; MTX, Metotrexato; GI, gastrointestinal; PFH, Provas de função hepática
Os valores estão apresentados sob a forma de: frequência absoluta (percentagem).

*Nomeadamente febre e/ou rash, e/ou nódulos cutâneos, e/ou artralgias, e/ou mialgias.

Com o primeiro imunossupressor, o efeito adverso mais frequente foi a leucopenia. A alteração das PFH, a intolerância GI e a pancreatite aguda também ocorreram num número considerável de pacientes. Todos os efeitos adversos que ocorreram com o primeiro imunossupressor foram mais comuns com a utilização de tiopurina (**Tabela 6**).

Nos pacientes que fizeram o segundo imunossupressor, ocorreram efeitos adversos apenas nos indivíduos medicados com MTX, o fármaco mais usado neste segundo grupo, tendo sido a intolerância GI o efeito adverso mais comum (**Tabela 6**).

No grupo de pacientes que apresentaram infeção grave como reação adversa, as situações verificadas foram dois casos de abscesso hepático, um caso de tuberculose pulmonar e um caso de sépsis. Foi ainda considerado neste grupo, um paciente com suspeita de tuberculose pulmonar, não confirmada até à data.

Dos pacientes medicados com o primeiro imunossupressor, 35.8% interromperam o tratamento, transitória ou temporariamente e 10.4% substituíram-no por um fármaco de

classe diferente (o segundo imunossupressor). Os factores que motivaram a interrupção ou substituição do fármaco estão descritos na **Tabela 7**. Dos indivíduos que interromperam ou substituíram o imunossupressor, 81 (47.2%) fizeram-no devido à ocorrência de reações adversas.

Não foi possível avaliar adequadamente o impacto individual de cada reação adversa como motivo de paragem ou substituição do fármaco, uma vez que alguns indivíduos apresentavam mais do que uma reação adversa. Independentemente de terem ocorrido isoladamente ou em simultâneo, a percentagem das reações adversas que motivaram suspensão ou substituição do tratamento foi a seguinte:

- 52.9% dos pacientes com anemia;
- 47.5% dos pacientes com leucopenia;
- 46.4% dos pacientes com alterações das PFH;
- 92.3% dos pacientes com intolerância GI;
- 100.0% dos pacientes com pancreatite aguda;
- 50.0% dos pacientes com trombocitopenia;
- 81.2% dos pacientes com pancitopenia;
- 91.7% dos pacientes com reação de hipersensibilidade;
- 100.0% dos pacientes com infeção grave;
- 100.0% dos pacientes com síndrome mielodisplásico;
- 0.0% dos pacientes com hepatite colestática;

Das situações apresentadas acima, a pancreatite aguda, a trombocitopenia, o síndrome mielodisplásico e as reações de hipersensibilidade com predomínio das artralguas, foram as únicas reações adversas que ocorreram isoladamente, e como tal, para estas, o motivo da interrupção ou substituição do imunossupressor pode ser atribuído a uma única reação.

Tabela 7 - Motivo de interrupção ou substituição do 1º imunossupressor, por tipo de fármaco

Motivo	Tiopurina		MTX	
	Paragem	Substituição	Paragem	Substituição
Reação adversa	77 (49.7%)	7 (35.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)
Ausência de resposta	26 (16.8%)	8 (40.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)
Escalada para BIO	19 (12.3%)	2 (10.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)
Remissão Prolongada	3 (1.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Outras	28 (18.1%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Não Reportada	2 (1.3%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Abreviaturas: MTX, Metotrexato; BIO, fármaco biológico (anti-TNF α)

Os valores estão apresentados sob a forma de: frequência absoluta (percentagem).

Para os pacientes medicados com uma tiopurina, o principal motivo quer para a interrupção quer para substituição do imunossupressor foi a intolerância GI e os motivos menos frequentes foram a infeção grave e a remissão prolongada, igualmente para a interrupção ou substituição do fármaco. Nos pacientes medicados com MTX e das duas interrupções verificadas, os motivos foram a ausência de resposta e a escalada para fármaco biológico. O único paciente deste grupo que substituiu o imunossupressor, fê-lo por intolerância GI.

Tabela 8 - Motivo de interrupção ou substituição do 2º imunossupressor, por tipo de fármaco.

Motivo	Tiopurina		MTX	
	Paragem	Substituição	Paragem	Substituição
Reação Adversa	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (16.7%)	0 (0.0%)
Ausência de resposta	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (12.5%)	0 (0.0%)
Escalada para BIO	0 (0.0%)	0 (0.0%)	11 (45.8%)	0 (0.0%)
Remissão	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.2%)	0 (0.0%)
Outras	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (12.5%)	0 (0.0%)
Não Reportada	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (8.3%)	0 (0.0%)

Abreviaturas: MTX, Metotrexato; BIO, fármaco biológico (anti-TNF α)

Os valores estão apresentados sob a forma de: frequência absoluta (percentagem).

Dos pacientes que fizeram o 2º imunossupressor, foi necessário interromper o tratamento em 60.0% dos indivíduos, sendo o motivo mais frequente para a interrupção, a necessidade de escalada para monoterapia com fármaco biológico (**tabela 8**).

2ª Fase: Quantificação e Caracterização dos Monócitos por Citometria de Fluxo

• População

Foram estudados 25 doentes com doença inflamatória intestinal (DII), 14 homens e 11 mulheres, com uma mediana de idades de 44 anos, 17 com doença de Crohn (DC) e 8 com colite ulcerosa (CU), com indicação clínica para iniciar tratamento com azatioprina (AZA). Destes, 14 tinham doença clinicamente ativa (DCA) e 11 estavam em remissão clínica (DRC). Seis doentes estavam a fazer corticosteróides por via oral, em redução de dose, na data em que foram avaliados, antes de iniciar a medicação com o imunossupressor (tempo 0) (**Tabela 9**).

O estudo consistiu na realização de hemograma em contador hematológico automático e na quantificação e caracterização dos monócitos do sangue periférico, por citometria de fluxo. Foram, nomeadamente, identificados os monócitos com base na co-expressão de CD45 e CD14 (CD45+CD14+) e determinada a sua percentagem; de seguida, foram quantificadas as frações de monócitos CD14+CD16- e CD14+CD16+. Os resultados obtidos nos doentes com DII foram comparados com os obtidos no grupo controlo, constituído por 25 indivíduos saudáveis, dadores benévolos de sangue, emparelhados para a idade e género (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Características demográficas e clínicas dos doentes com DII e dos controlos

	Controlos (n=25)	Doentes (n=25)	P*
Género*			
M / F	14 / 11	13 / 12	NS
Idade**			
Anos	44 (19-66)	37 (19-67)	NS
Tipo de DII*			
DC / CU	NA	17 / 8	NA
Atividade da doença*			
DCA / DRC	NA	14 / 11	NA
Tratamentos (além da azatioprina)***			
Messalazina	NA	8 (32%)	NA
Corticoterapia	NA	5 (20%)	NA
Isoniazida	NA	5 (20%)	NA
Budesonido	NA	4 (16%)	NA
Infliximab (anti-TNF α)	NA	3 (12%)	NA
Salazopirina	NA	1 (4%)	NA

Abreviaturas: M, masculino; F, feminino; DC, Doença de Crohn; CU, Colite Ulcerosa; DII, Doença Inflamatória Intestinal; DCA, Doença clinicamente ativa; DRC, Doença em remissão clínica; NA, não aplicável; NS, estatisticamente não significativo.

* Os dados estão apresentados sob a forma de frequência absoluta.

** Os dados estão apresentados sob a forma de mediana e intervalo (mínimo e máximo).

*** Os dados estão apresentados sob a forma de frequência absoluta (percentagem)

****Teste de Mann Withney. A diferença foi considerada significativamente estatística quando $p < 0,05$.

Após colheita de sangue, os 25 pacientes com DII iniciaram tratamento com AZA mas destes, apenas 20 repetiram a colheita de sangue, durante o tratamento com o imunossupressor (tempo 1) (**Tabela 10**). Cinco destes doentes estavam medicados com corticosteróides, já em fase de redução da dose, no momento em que iniciaram a AZA, tendo suspenso a corticoterapia entre os dois momentos em análise.

A azatioprina foi iniciada na dose mediana de 2.0 mg/kg, com ajustamento posterior em função da resposta clínica e da tolerância à terapêutica, com o objetivo de atingir doses terapêuticas entre 2.0 e 2.5 mg/kg; a mediana da dose de manutenção foi de 2.3 ± 0.4 mg/kg, variando entre 0.6 a 2.7 mg/Kg. A mediana do tempo decorrido entre a colheita da primeira amostra (tempo 0) e a colheita da segunda amostra (tempo 1) foi de 152 dias, variando entre 90 e 266 dias, a que correspondeu uma mediana de 131 dias de terapêutica, com um mínimo de 78 e o máximo de 266 dias.

Tabela 10 – Características demográficas e clínicas dos doentes com DII que foram reavaliados após iniciar o tratamento com azatioprina.

	Doentes (n=20)
Género*	
M / F	11 / 9
Idade**	
Anos	36 (19-67)
Tipo de DII*	
DC / CU	14 / 6
Atividade da Doença*	
DCA / DRC	11 / 9
Corticoterapia*	
Não / Sim*	15 / 5
Intervalos de tempo (dias)***	
Tempo decorrido entre as avaliações	158 ± 52 ; 152 (90-266)
Tempo de tratamento com azatioprina	143 ± 50 ; 131 (78-266)
Dose de azatioprina (mg/kg)***	
Início	1.8 ± 0.7 ; 2.0 (0.6-2.9)
Manutenção	2.2 ± 0.4 ; 2.3 (0.6-2.7)

Abreviaturas: M, masculino; F, feminino; DC, Doença de Crohn; CU, Colite Ulcerosa; DII, Doença inflamatória intestinal; DCA, Doença clinicamente ativa; DRC, Doença em remissão clínica.

* Os resultados estão apresentados sob a forma de frequência absoluta.

**Os resultados estão apresentados sob a forma de mediana e intervalo (mínimo – máximo)

*** Os resultados estão apresentados como média \pm desvio-padrão; mediana (mínimo - máximo)

• **Valores Hematológicos**

Quando comparados com o grupo de controlo, os doentes com DII apresentavam valores superiores do número absoluto de leucócitos ($p=0.001$), da percentagem ($p=0.019$) e do número absoluto ($p=0.002$) de neutrófilos, e do número absoluto de monócitos ($p=0.047$) e de plaquetas ($p<0.001$) assim como valores inferiores da percentagem de linfócitos ($p=0.025$) (**Tabela 11**).

No entanto, estas alterações, à exceção do aumento do número absoluto de leucócitos e de plaquetas, só eram estatisticamente significativas nos doentes medicados com corticosteróides (**Tabela 12**).

Tabela 11 – Valores hematológicos dos doentes com DII, antes de iniciar azatioprina, e dos controlos

	Controlos (C) (n=25)	Doentes (D) (n=25)	P* (D vs C)*
Leucócitos			
x10 ⁶ /L	6408 \pm 986 6500 (4700-8400)	9364 \pm 4337 7900 (3200-21900)	<0.001
Neutrófilos			
%leucócitos	60.0 \pm 9.5 61.4 (37.2-78.1)	67.8 \pm 11.2 64.7 (48.0-93.0)	0.019
x10 ⁶ /L	3881 \pm 1032 3754 (2232-6014)	6706 \pm 4171 5111 (1811-17856)	0.002
Linfócitos			
%leucócitos	29.6 \pm 7.6 28.5 (14.6-47.2)	23.5 \pm 9.5 23.2 (4.2-41.9)	0.025
x10 ⁶ /L	1874 \pm 476 1817 (1124-2854)	1920 \pm 605 1898 (806-3132)	NS
Monócitos			
%leucócitos	7.1 \pm 2.8 7.0 (1.4-14.2)	6.5 \pm 2.1 6.0 (2.8-10.2)	NS
x10 ⁶ /L	446 \pm 157 470 (118-724)	555 \pm 170 538 (277-876)	0.047
Hemoglobina			
g/dL	14.2 \pm 1.4 13.9 (12.1-16.6)	13.5 \pm 1.6 13.5 (9.6-16.0)	NS
Plaquetas			
x10 ⁶ /L	211 \pm 65 201 (132-455)	286 \pm 97 247 (173-529)	<0.001

Abreviaturas: M, masculino; F, feminino; DC, Doença de Crohn; CU, Colite Ulcerosa; DII, Doença inflamatória intestinal; DCA, Doença clinicamente ativa; DRC, Doença em remissão clínica; NA, não aplicável; NS, estatisticamente não significativo ($p > 0.05$)

Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão, mediana e intervalo (mínimo e máximo).

*Teste de Mann Withney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

Tabela 12 – Valores hematológicos dos doentes com DII medicados e não medicados com corticosteróides

	Doentes não medicados com corticosteroides (D1) (N=19)	Doentes medicados corticosteroides (D2) (N=6)	P* (D1 vs D2)	P* (D1 vs C)	P* (D2 vs C)
Leucócitos					
x10 ⁶ /L	7884 \pm 2424 7200 (3200- 13800)	14050 \pm 6250 13300 (7000- 21900)	0.011	0.013	<0.001
Neutrófilos					
%leucócitos	62.8 \pm 9.7 64.8 (48.0-81.5)	77.5 \pm 12.2 79.8 (61.2-93.0)	0.026	NS	0.003
X10 ⁶ /L	4494 \pm 2285 5271 (1811- 10488)	11252 \pm 5872 10734 (4837- 17856)	0.009	NS	0.003
Linfócitos					
%leucócitos	27.5 \pm 8.7 25.6 (10.9-41.9)	16.8 \pm 9.5 14.7 (4.2-31.1)	0.042	NS	0.006
x10 ⁶ /L	1898 \pm 487 1879 (989-2724)	2051 \pm 837 2005 (806-3132)	NS	NS	NS
Monócitos					
%leucócitos	6.9 \pm 1.9 7.0 (3.4-10.2)	4.6 \pm 2.1 4.9 (2.8-7.5)	0.030	NS	0.04
x10 ⁶ /L	522 \pm 168 532 (277-856)	627 \pm 197 557 (449-876)	NS	NS	0.036
Hemoglobina					
g/dL	13.9 \pm 1.4 14.1 (11.4-16.)0	12.0 \pm 1.6 12.5 (9.6-13.5)	0.011	NS	0.007
Plaquetas					
x10 ⁶ /L	268 \pm 87 230 (173-487)	344 \pm 105 342 (227-529)	NS	0.004	0.002

Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão, mediana e intervalo (mínimo e máximo).

*Teste de Mann Withney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

- **Estudo dos Monócitos por Citometria de Fluxo**

Quantificação e caracterização dos monócitos do sangue periférico

A percentagem de monócitos, obtida nos doentes com DII antes do início da AZA e nos controlos, determinada por citometria de fluxo (células CD45+CD14+), correlacionava-se positivamente com a obtida pela contagem automática de células em contador hematológico ($p < 0.001$; $r = 0.733$) (**Figura 3**).

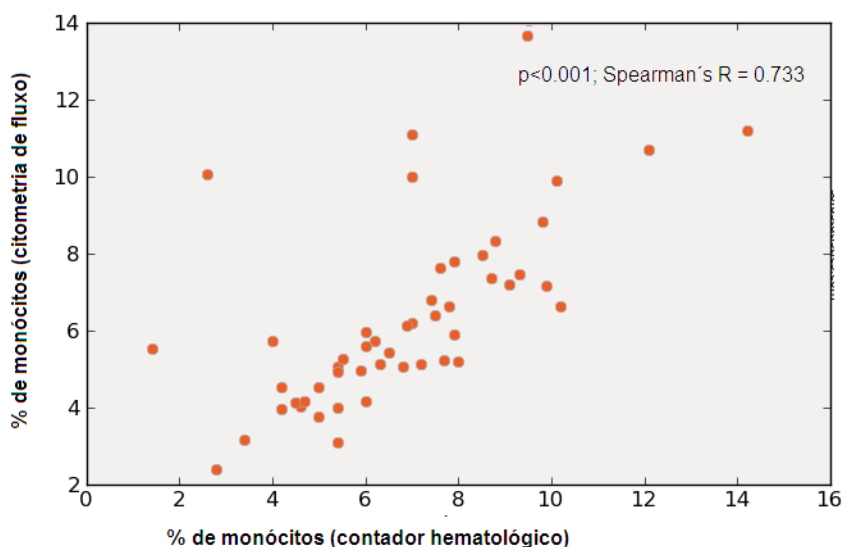


Figura 3 - Correlação entre a contagem de monócitos por citometria de fluxo e a contagem de monócitos obtida no contador hematológico automático, observada no total dos indivíduos estudados (n=50). Teste t de Spearman,

Os doentes com DII, não apresentaram alterações significativas na percentagem e no valor absoluto de monócitos (CD45+CD14+), comparativamente aos controlos. Contudo, verificou-se que nos pacientes com DII, a percentagem de monócitos pró-inflamatórios (CD14+CD16+) era significativamente inferior à observada nos controlos ($p = 0.003$) (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Percentagens e números absolutos de monócitos totais (CD45+CD14+) e de monócitos pró-inflamatórios (CD14+CD16+) do sangue periférico, avaliadas por citometria de fluxo, nos doentes com doença inflamatória intestinal antes do início do tratamento com azatioprina e nos controlos.

	Monócitos (CD45+CD14+)		Monócitos pró-inflamatórios (CD14+CD16+)	
	% Leucócitos	X10 ⁶ /L	% Monócitos	x10 ⁶ /L
Controlos (n=25)	6.8±2.8	431±183	15.8±5.8	72±56
	5.5	395	16.9	55
	3.1-13.8	188-1036	5.3-24.8	29-306
Doentes (n=25)	5.9±1.9	527±251	10.4±5.3	33±42
	5.8	465	11.6	50
	2.4-11.1	230-1259	0.2-18.7	2-128
P*	NS	NS	0.003	NS

Abreviaturas: NS, estatisticamente não significativo (p>0.05)

Os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão, mediana e intervalo (mínimo e máximo).

* Teste de Mann Withney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando p<0.05.

Para análise das subpopulações monocitárias, os pacientes com DII foram posteriormente agrupados de acordo com a toma ou não de corticosteróides, tendo-se verificado diferenças importantes, para as percentagens de monócitos CD14+CD16+, entre os doentes sob corticoterapia e aqueles que não estavam medicados com corticosteróides (**Figura 4**).

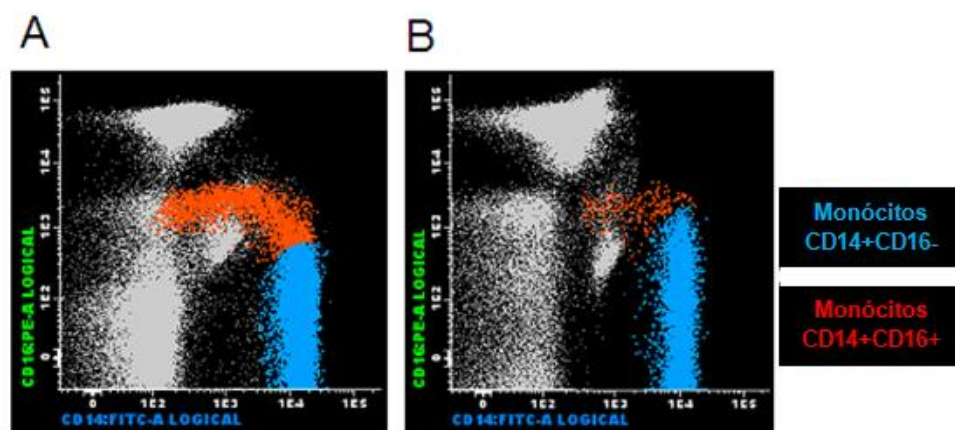


Figura 4 – Gráficos biparamétricos (CD16 versus CD14), obtidos por citometria de fluxo, onde se representam as subpopulações de monócitos CD14+CD16- (pontos azuis) e CD14+CD16+ (pontos vermelhos) de um doente com DII não medicado com corticosteróides (painel A) e de um doente com DII medicado com corticosteróides (painel B). Os pontos cinzentos representam os restantes leucócitos do sangue periférico.

De facto, os indivíduos que estavam medicados com corticosteróides previamente à introdução da AZA, tinham percentagens de monócitos CD14+CD16+ (média \pm desvio padrão: $5.3 \pm 1.9\%$; mediana 2.1%; intervalo: 0.2-4.8%) muito inferiores aos indivíduos sem corticoterapia ($13.0 \pm 2.6\%$; 12.3%; 7.1-18.7%) ($p < 0.001$) (**Figura 5, painel A**).

Estes resultados mantiveram a sua significância quando os valores absolutos dos monócitos CD14+CD16+, foram comparados, para os mesmos grupos (**Figura 5, painel B**).

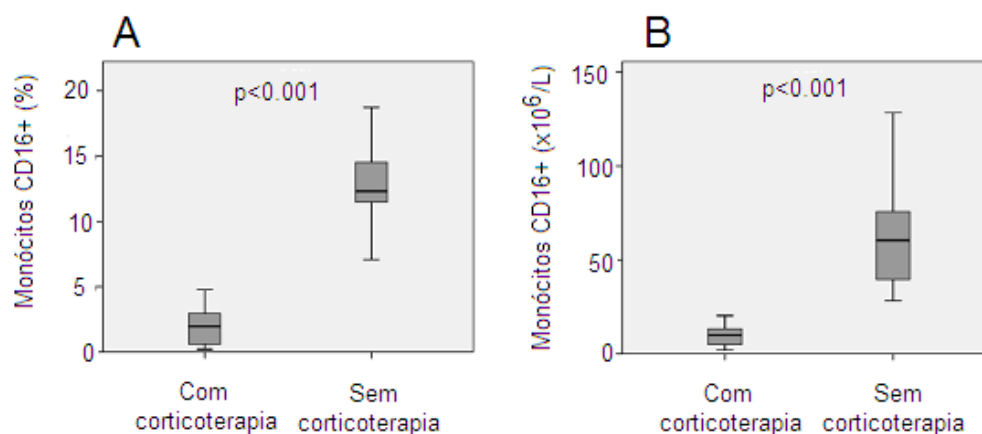


Figura 5 – Percentagem (painel A) e número absoluto (painel B) de monócitos CD14+CD16+, nos pacientes com DII a tomar ($n=6$) ou não ($n=19$) corticosteróides, previamente à introdução da azatioprina.

A caixa (*box plot*) representa a amplitude interquartil, sendo que os seus limites, superior e inferior, correspondem respetivamente, ao percentil 75 e 25, e o segmento que a intersecta, à mediana. As extremidades das linhas verticais representam, o valor máximo (extremidade superior) e mínimo (extremidade inferior) observados.

*Teste de Mann Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

De seguida, excluindo os casos medicados com corticosteróides, procedemos à comparação entre doentes com DC ($n=14$) e doentes com CU ($n=5$), tendo sido constatado que não havia diferenças estatisticamente significativas entre a percentagem de monócitos CD14+CD16+ nos doentes com DC (média \pm desvio padrão: $12.8 \pm 2.5\%$; mediana: 12.8%; intervalo: 7.1-17.0%) e essa mesma percentagem nos doentes com CU ($13.7 \pm 3.1\%$; 12.3%; 11.4-18.7%), antes da introdução da AZA (**Figura 6, painel A**). Contudo, quando foram comparados os valores absolutos, verificou-se que os indivíduos com CU apresentavam um maior número absoluto de monócitos CD14+CD16+ (média \pm desvio padrão: $90 \pm 29 \times 10^6/L$; mediana: $91 \times 10^6/L$; intervalo: $60-128 \times 10^6/L$), em relação aos indivíduos com DC ($53 \pm 19 \times 10^6/L$; $49 \times 10^6/L$; $28-87 \times 10^6/L$) (**Figura 6, painel B**).

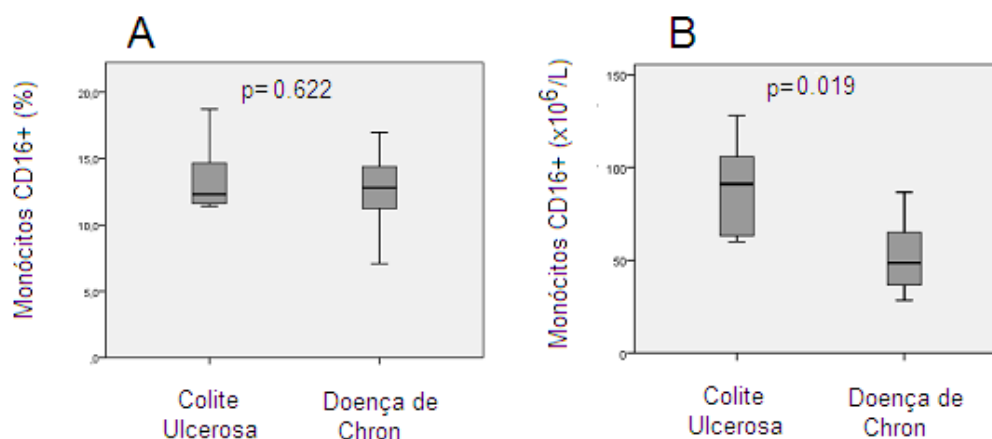


Figura 6 – Percentagem (painel A) e número absoluto (painel B) de monócitos CD14+CD16+, nos pacientes com doença de Crohn (n=14) e nos doentes com Colite Ulcerosa (n=5) não medicados com corticosteróides, previamente à introdução da azatioprina.

A caixa (*box plot*) representa a amplitude interquartil, sendo que os seus limites, superior e inferior, correspondem respetivamente, ao percentil 75 e 25, e o segmento que a intersecta, à mediana. As extremidades das linhas verticais representam, o valor máximo (extremidade superior) e mínimo (extremidade inferior) observados.

*Teste de Mann Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

Finalmente, e também excluindo os casos medicados com corticosteróides, procedemos à comparação entre doentes com DCA (n=9) e doentes com DRC (n=10), antes da introdução da AZA, tendo-se verificado que não havia diferença estatisticamente significativa na percentagem de monócitos CD14+CD16+ entre os pacientes em remissão clínica (média \pm desvio padrão: $13.2 \pm 2.7\%$; mediana: 14.1; intervalo: 7.1-17.0%) e aqueles com doença ativa ($12.8 \pm 2.5\%$; mediana 11.6; intervalo: 11.0-18.7 (**Figura 7, painel A**). Havia, no entanto, uma tendência para valores absolutos de monócitos CD14+CD16+ mais elevados nos pacientes com DCA (média \pm desvio padrão: $75 \pm 30 \times 10^6/L$; mediana $67 \times 10^6/L$; intervalo: 36-128 $\times 10^6/L$) em relação aos observados nos doentes com DCR (51 ± 17 ; 49; 28-84) ($p=0.065$) (**Figura 7, painel B**).

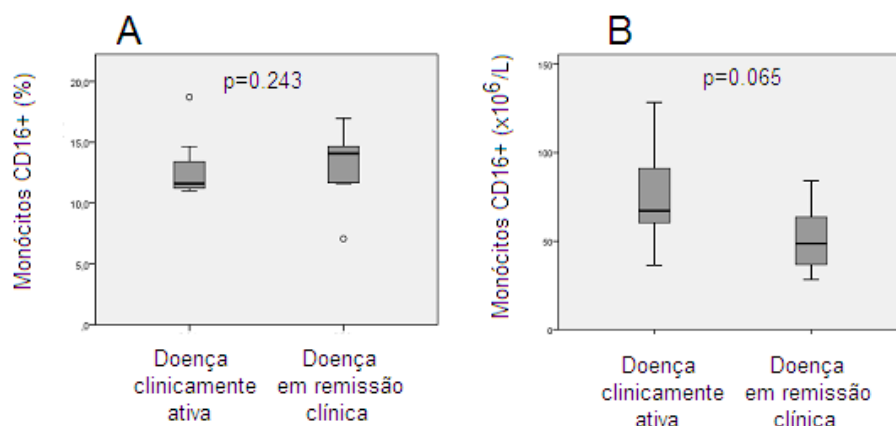


Figura 7 – Percentagem (painel A) e número absoluto (painel B) de monócitos CD14+CD16+, nos pacientes com doença clinicamente ativa (n=9) e nos doentes com remissão clínica (n=10) não medicados com corticosteróides, previamente à introdução da azatioprina.

A caixa (*box plot*) representa a amplitude interquartil, sendo que os seus limites, superior e inferior, correspondem respetivamente, ao percentil 75 e 25, e o segmento que a intersecta, à mediana. As extremidades das linhas verticais representam, o valor máximo (extremidade superior) e mínimo (extremidade inferior) observados.

*Teste de Mann Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

Efeito do tratamento com azatioprina nos monócitos CD14+CD16+

A **tabela 14** descreve as populações de monócitos dos pacientes com DII avaliados antes e depois do tratamento com AZA, independentemente da utilização de corticosteróides

Tabela 14 - Contagem de monócitos e caracterização das populações monocitárias do sangue periférico dos doentes com doença inflamatória intestinal, avaliados antes e durante o tratamento com azatioprina.

	Antes de iniciar AZA (Tempo 0)	Durante tratamento com AZA (Tempo 1)	P
Monócitos (CD45+CD14+)			
% dos leucócitos	6.0 \pm 2.0 5.9 (2.4-11.1)	7.8 \pm 4.5 6.8 (4.0-23.6)	NS
$\times 10^6/L$	548 \pm 272 463 (230-1259)	454 \pm 202 378 (224-967)	NS
Monócitos CD14+CD16+			
% dos monócitos	10.4 \pm 5.6 11.8 (0.2-18.7)	9.6 \pm 4.1 9.4 (4.4-18.3)	NS
$\times 10^6/L$	51 \pm 35 41 (2-128)	43 \pm 20 42 (15-101)	NS

Abreviaturas: NS, estatisticamente não significativo ($p > 0.005$)

Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão, mediana e intervalo (mínimo e máximo).

* Teste de Mann Withney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

Uma vez que, tal como constatado anteriormente, a toma de corticosteróides influencia os valores de monócitos CD14+CD16+, procedeu-se a uma segunda análise dos resultados, ao tempo 0 e ao tempo 1, considerando separadamente os indivíduos com (n=5) e sem (n=15) corticoterapia prévia.

A percentagem de monócitos CD14+CD16+ nos pacientes sob corticoterapia, antes e durante parte do tratamento com AZA, mostrou uma variação significativa entre os dois tempos de análise (**Figura 8, painel A**). No tempo 0, estes indivíduos estavam medicados com corticosteroide sistémico e apresentavam uma depleção de monócitos CD14+CD16+ (média \pm desvio padrão: $2.0 \pm 1.5\%$; mediana: 1.9%; intervalo: 0.2-4.8%), contudo, no tempo 1, momento em que todos os pacientes tinham já suspenso o corticosteroide, a sua percentagem de monócitos CD14+CD16+ já tinha recuperado parcialmente ($8.9 \pm 5.4\%$; 5.9%; 5.7-18.3%). Para os valores absolutos de monócitos CD14+CD16+, esta tendência mantém-se, contudo, sem significância estatística (**Figura 8, painel B**).

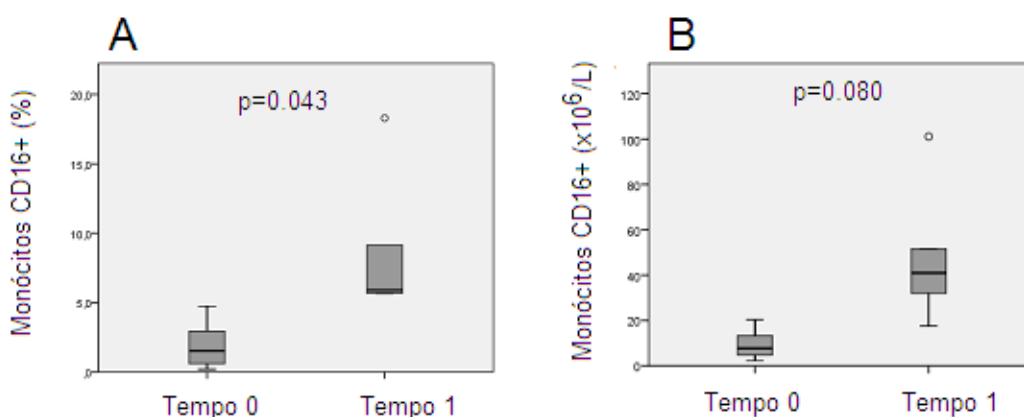


Figura 8 – Percentagem (painel A) e número absoluto (painel B) de monócitos CD14+CD16+, antes (tempo 0) e durante (tempo 1) o tratamento com azatioprina, nos pacientes com DII medicados com corticosteróides, previamente à introdução deste imunossupressor (n=5).

A caixa (*box plot*) representa a amplitude interquartil, sendo que os seus limites, superior e inferior, correspondem respetivamente, ao percentil 75 e 25, e o segmento que a intersecta, à mediana. As extremidades das linhas verticais representam, o valor máximo (extremidade superior) e mínimo (extremidade inferior) observados. Os pontos afastados constituem outliers.

*Teste de Wilcoxon. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

Pelo contrário, nos pacientes que não estavam medicados com corticosteroides, observou-se uma diminuição significativa da percentagem de monócitos CD14+CD16+ (**Figura 9, painel A**), com uma acentuada redução destes valores, entre o tempo 0

(média \pm desvio padrão: $13.2 \pm 2.8\%$; mediana: 13.4% ; intervalo: $7.1-18.7\%$) e o tempo 1 ($9.8 \pm 3.8\%$; 10.5% ; $4.4-15.8\%$) ($p=0.080$). O mesmo se observou para o número absoluto de monócitos CD14+CD16+, que também reduziu significativamente do tempo 0 (média \pm desvio padrão: $65 \pm 29 \times 10^6/L$; mediana: $64 \times 10^6/L$; intervalo: $36-128 \times 10^6/L$) para o tempo 1 ($41 \pm 15 \times 10^6/L$; $44 \times 10^6/L$; $15-68 \times 10^6/L$) ($p=0.004$) (**Figura 9, painel B**).

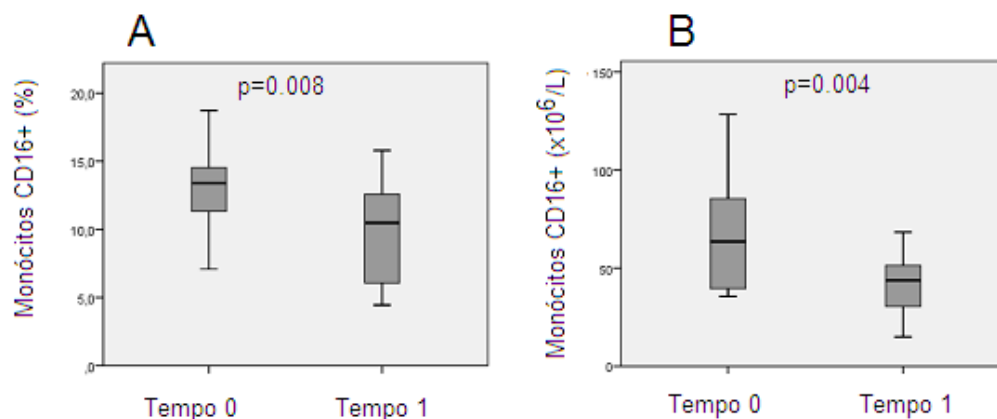


Figura 9 – Percentagem (painel A) e número absoluto (painel B) de monócitos CD14+CD16+, antes (tempo 0) e durante (tempo 1) o tratamento com azatioprina, nos pacientes com DII não medicados com corticosteróides, previamente à introdução deste imunossupressor ($n=15$).

A caixa (*box plot*) representa a amplitude interquartil, sendo que os seus limites, superior e inferior, correspondem respetivamente, ao percentil 75 e 25, e o segmento que a intersecta, à mediana. As extremidades das linhas verticais representam, o valor máximo (extremidade superior) e mínimo (extremidade inferior) observados.

*Teste de Wilcoxon. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

DISCUSSÃO

1ª Fase: Caracterização da utilização de imunossupressores nos pacientes com DII

O início precoce da terapêutica imunossupressora, aquando do diagnóstico da DII, parece afetar o curso da doença, em particular no que respeita à DC. Não existe até à data um grande número de estudos que suportem estas evidências, no entanto, estudos desenvolvidos na população pediátrica mostraram que o início precoce da imunossupressão permitiu uma redução na utilização de corticoterapia nestes doentes, bem como uma redução da necessidade de internamento (143). No presente estudo, a duração média de tempo decorrido entre o diagnóstico da doença e o início de imunossupressor, foi bastante semelhante entre a DC e a CU, não excedendo os seis meses para nenhuma das duas. Esta abordagem poderá refletir a tentativa, por parte dos profissionais que lidam com esta doença, de atuar precocemente a fim de obter um rápido controlo da doença.

A duração média do tratamento com o primeiro imunossupressor foi diferente para a DC e para a CU, respetivamente 32.3 e 18.2 meses. A duração do tratamento imunossupressor parece ser um importante preditor da resposta, sobretudo no que respeita à manutenção da remissão, na medida em que a dose cumulativa do fármaco desempenha um papel essencial. Pearson e *col* publicaram em 1995, a primeira meta-análise reconhecendo a eficácia das tiopurinas na indução da remissão na DC, tendo verificado também a influência da duração do tratamento com este fármaco na melhoria da resposta nos pacientes com doença ativa (93). Posteriormente vários estudos confirmaram estes achados. Um dos mais recentes, é um estudo multicêntrico europeu que confirma o papel dos imunossupressores na manutenção da remissão na DII, a longo prazo (144).

Vários estudos têm demonstrado a eficácia das tiopurinas e do MTX na DII. No presente trabalho verificou-se que 60.3% dos pacientes com DC e 15.3% dos pacientes com CU iniciaram pelo menos um curso de tratamento com imunossupressores (tiopurina e MTX), e respetivamente 11.6% e 1.9% iniciaram um segundo curso com imunossupressor. A utilização dos imunossupressores na DC está mais bem estudada e relatada, em comparação com a sua utilização na CU, na qual parecem ser menos eficazes.

A azatioprina foi o fármaco mais utilizado na primeira utilização de imunossupressores, em 97.7% dos pacientes que fizeram imunossupressor. No que respeita à utilização do segundo imunossupressor, a maioria dos pacientes fez MTX, nomeadamente 97.5%. A eficácia da azatioprina na indução e manutenção da DC está documentada em vários ensaios clínicos randomizados. Na última revisão de Cochrane,

verificou-se uma vantagem da azatioprina sob o placebo, com um *odds ratio* de 2.43 (95%CI: 1.62-3.64) na indução da remissão e de 2.32 (95%CI: 1.55-3.49) para a manutenção da remissão (145, 146). No que respeita à CU, as evidências relativamente ao benefício da utilização da azatioprina não são tão fortes, contudo mostram eficácia na manutenção da remissão. Uma meta-análise recente mostrou uma vantagem da azatioprina sob o placebo na prevenção da recidiva, com um *odds ratio* de 2.56 (95%CI: 1.51-4.34) (147). O MTX é a principal alternativa às tiopurinas, mas apesar de vários estudos terem já tentado esclarecer o papel deste fármaco na DII, o seu valor terapêutico permanece alvo de controvérsia, dependendo inclusive da via de administração utilizada (148). O MTX é normalmente reservado para os pacientes intolerantes ou não respondedores às tiopurinas, motivo pelo qual foi utilizado num pequeno número de pacientes como primeiro imunossupressor e na maioria dos pacientes como segundo imunossupressor. Dos pacientes que fizeram o 1º imunossupressor, verificou-se que 16.1% dos pacientes com DC e 3.5% dos pacientes com CU, necessitaram de tratamento combinado com um agente anti-TNF α , em algum momento após início do imunossupressor. No estudo GETAID, demonstraram-se os benefícios da utilização da terapêutica combinada com IFX nos pacientes com DC, comparativamente à utilização da AZA em monoterapia. Nos pacientes com terapia combinada verificou-se a existência de um maior número de remissões livres de corticoterapia, bem como, de cicatrização da mucosa, comparativamente à monoterapia (149). Estas evidências foram reforçadas, recentemente pelo estudo SONIC, que concluiu favoravelmente em relação às vantagens da terapêutica combinada com AZA e IFX, comparativamente à monoterapia com AZA, e à monoterapia com IFX, na manutenção da remissão clínica sem corticosteróides, em pacientes com DC moderada a grave (117). Os benefícios da terapêutica combinada com AZA e IFX, na CU moderada a grave, foram também recentemente demonstrados por um estudo, ainda não publicado (UC SUCCESS), que refere a superioridade do tratamento combinado, em comparação com a monoterapia com AZA ou com IFX na indução da remissão, sem corticosteróides, bem como na cicatrização da mucosa intestinal (150).

Apesar da frequente utilização da AZA na DII, e da sua aplicação estar bem definida nas *guidelines* atuais, alguns estudos têm relatado a inexistência de significância estatística que confirme os seus benefícios. Esta diferença parece relacionar-se com alguns aspetos particulares do tratamento, nomeadamente a sua duração (151). No presente estudo, a duração média do tratamento foi bastante diferente para as duas DII consideradas, verificando-se uma duração média de tratamento de quase 3 anos para a DC e de menos de 2 anos para a CU. A maioria dos pacientes que interrompeu o tratamento antes dos 6 meses, fê-lo devido a reações adversas. Apenas um paciente

necessitou de fazer escalada para um agente anti-TNF α após um mês de tratamento, e outro suspendeu o imunossupressor ao terceiro mês por ausência de resposta e agravamento clínico.

Na DC, os imunossupressores foram utilizados com maior frequência nos indivíduos que apresentavam localização ileocólica (L3) ou atingimento do trato digestivo proximal (L4), bem como naqueles com doença de comportamento penetrante ou estenosante. Ainda na DC, foram os pacientes com diagnóstico da doença em idade mais jovem (A1), que mais necessitaram de terapêutica imunossupressora. A existência de doença perianal nos pacientes com DC associou-se a uma necessidade aumentada de utilizar tratamento com imunossupressores. Na CU os indivíduos com doença extensa (E3) utilizaram imunossupressores com maior frequência. Estes dados podem ser explicados pelo facto dos fenótipos referidos se associarem a doença mais grave, e como tal, haver uma maior necessidade de recorrer a terapêutica de segunda linha. A localização da doença, na DC, parece ser um importante fator preditor da progressão da doença (152). Foi já verificado um maior risco de progressão para doença complicada nos indivíduos com doença do intestino delgado, comparativamente à do cólon (152, 153). O comportamento estenosante e o comportamento penetrante foram também associados a uma evolução mais agressiva, constituindo inclusive preditores da futura necessidade de cirurgia (154). A existência de manifestações perianais nos pacientes com DC constitui um outro preditor com forte correlação no risco de desenvolvimento de complicações nestes doentes (152, 153). Além disso, estudos envolvendo sobretudo a população pediátrica mostraram evidências dos benefícios do tratamento precoce com imunossupressor nos doentes que apresentam um maior risco de evoluir para doença agressiva. Para a CU, os preditores de mau prognóstico não se encontram bem avaliados por estudos de grande impacto. Contudo, alguns estudos de menores dimensões identificaram a extensão da doença como um indicador da necessidade hospitalização, bem como de colectomia (155, 156).

A indicação mais frequente para imunossupressão, nos pacientes que utilizaram as tiopurina como primeiro fármaco, foi a gravidade da doença, seguindo-se a corticodependência e a profilaxia pós cirurgica. Nos pacientes que fizeram MTX como primeiro imunossupressor, destaca-se como principal indicação a existência de manifestações extraintestinais. Tendo em conta as evidências atuais de que algumas características da doença constituem preditores de curso mais agressivo, e se relacionam com a necessidade de cirurgia GI e de aumento do risco de cancro colo rectal, é lógico que a utilização precoce dos imunossupressores nos doentes que apresentam estas características pode ser uma importante arma para travar a progressão da doença.

Apesar da controvérsia em torno da utilização precoce dos imunossuppressores, existem estudos, desenvolvidos na população pediátrica com DC moderada a grave, relatando o efeito desta atitude na cicatrização da mucosa intestinal (143, 157). Ainda assim, é de extrema importância que novos estudos randomizados se desenvolvam nesta área nomeadamente estudos comparativos entre a azatioprina e o metotrexato, inexistentes até à data. Apesar das *guidelines* atuais recomendarem a utilização do MTX, e do seu papel na indução e manutenção da remissão na DC, ele é frequentemente remetido para terapêutica de segunda linha, devido, sobretudo, aos seus potenciais efeitos adversos (9, 158). A escolha do MTX como primeiro imunossupressor tem sido sobretudo orientada para o tratamento das manifestações extraintestinais, particularmente as manifestações articulares (159), sem que contudo, existam estudos randomizados a confirmarem a sua eficácia nestas indicações. A evidência científica existente relativamente à utilização do MTX nas manifestações articulares dos pacientes com DII, advém de estudos de séries de casos e de *case reports*.

Nos pacientes que fizeram imunossupressor para profilaxia pós-cirúrgica, verificou-se uma tendência para que este tratamento fosse iniciado apenas aquando da recidiva endoscópica, em detrimento do seu início nos dois meses que sucedem a cirurgia. As recomendações atuais afirmam a eficácia da AZA na prevenção da recorrência pós-cirúrgica, enfatizando a importância de se iniciar o tratamento, idealmente até duas semanas após a cirurgia, ou pelo menos, nos dois meses seguintes, nomeadamente em grupos de alto risco para recidiva (fumadores, doença penetrante, doença anal, antecedentes de cirurgia intestinal) (160).

A resposta ao tratamento com imunossupressor foi analisada para quatro das indicações para o fármaco, e apenas nos indivíduos cuja duração do tratamento foi igual ou superior a 6 meses. Para as restantes indicações não foi possível fazer esta análise, tendo em conta a natureza retrospectiva deste estudo e as limitações ao nível do acesso a alguns dos dados necessários para essa análise. Verificou-se que uma resposta parcial foi obtida em mais de metade dos pacientes para todas as indicações, exceto para a corticodependência, ficando contudo muito próximo deste valor. Uma resposta completa foi obtida em quase um terço dos pacientes, e apenas em 13.8% dos pacientes não se verificou resposta. A eficácia dos imunossuppressores, tem sido reportada em vários estudos, estando descritas percentagens de remissão superiores às verificadas. A evidência científica é mais robusta para a capacidade de induzir e manter a remissão com azatioprina na DC do que na CU. Entretanto existem estudos, inclusive um realizado na população portuguesa (161), que relatam uma diminuição da eficácia da AZA, após alguns meses de tratamento (162). Estes dados podem justificar em parte a menor

percentagem de resposta aos imunossupressores, obtida neste trabalho, na medida em a duração média do tratamento foi superior a 30 meses para as duas DII. Além disso, tendo em conta a natureza retrospectiva deste estudo, poderão existir limitações em relação à precisão da definição da resposta.

Os efeitos adversos ocorreram em quase metade dos pacientes que fizeram o primeiro imunossupressor. A leucopenia foi o efeito adverso mais frequente, facto que é compatível com o que se encontra descrito na literatura, apesar de, na maioria dos estudos, ocorrer numa menor percentagem de pacientes (163). Esta discrepância poderá ser justificada pelos diferentes *cut off's* utilizados para os valores dos leucócitos. Outros efeitos adversos frequentes foram a alteração das provas de função hepática, a intolerância GI e a pancreatite aguda, que surgem também como o fazendo parte dos efeitos secundários mais frequentes, em vários outros trabalhos. A taxa de pancreatite aguda observada foi superior à reportada na literatura podendo-se questionar sobre a existência de diagnósticos de pancreatite aguda sem critérios clínico-laboratoriais o que não foi possível avaliar de forma segura dada a natureza retrospectiva do trabalho.

As reações adversas constituíram o principal motivo de interrupção ou substituição do imunossupressor, em 47.2% dos pacientes, valor que se encontra consideravelmente acima do verificado em estudos prévios (164), (165). A ausência de resposta e a necessidade de escalada para um agente anti-TNF- α foram também importantes motivos para a interrupção do primeiro imunossupressor. Estes dois motivos foram separados, por um lado porque alguns dos doentes que escalaram a terapêutica para um fármaco anti-TNF α apresentavam alguma resposta ao imunossupressor, apesar de parcial, e por outro, porque alguns dos doentes que suspenderam o fármaco por não apresentarem resposta, iniciaram tratamento com outro imunossupressor ou outro fármaco que não um anti-TNF α . Para o segundo imunossupressor, o principal motivo de paragem foi a escalada para agentes anti-TNF α , o que é facilmente compreensível, uma vez que não existem evidências científicas robustas que suportem a eficácia da terapêutica combinada com MTX e anti-TNF α no tratamento da doença de Crohn (166), contrariamente ao que já foi discutido para a AZA.

2ª Fase: Quantificação e Caracterização dos Monócitos por Citometria de Fluxo

- **Monócitos CD16+**

Nas décadas de 80 e 90 foram descritas e caracterizadas, no sangue periférico, duas populações de monócitos com base na expressão de CD14, que em conjunto com TLR4 (Toll-like receptor 4) forma o recetor para o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram negativas, e CD16, que é o recetor de baixa afinidade para a IgG (FcγRIII) (46, 167). Assim, para além dos monócitos clássicos, que predominam no sangue periférico e que apresentam uma intensidade forte de expressão de CD14 e não expressam CD16 (CD14+forteCD16-), foi identificada uma população de monócitos (designados “não clássicos”), que expressam CD14 com intensidade mais fraca e que, ao contrário dos primeiros, são CD16+ (CD14+fracoCD16+), contribuindo estes últimos para cerca de 10% dos monócitos circulantes nos indivíduos saudáveis. Estudos posteriores mais detalhados mostraram que existe uma terceira população de monócitos CD16+ com características fenotípicas intermédias (CD14+forteCD16+); estes monócitos, tal como os monócitos clássicos, expressam CD14 com intensidade forte, sendo a expressão de CD16 ligeiramente inferior à observada nos monócitos CD14+fracoCD16+ (168, 169) (Figura 10).

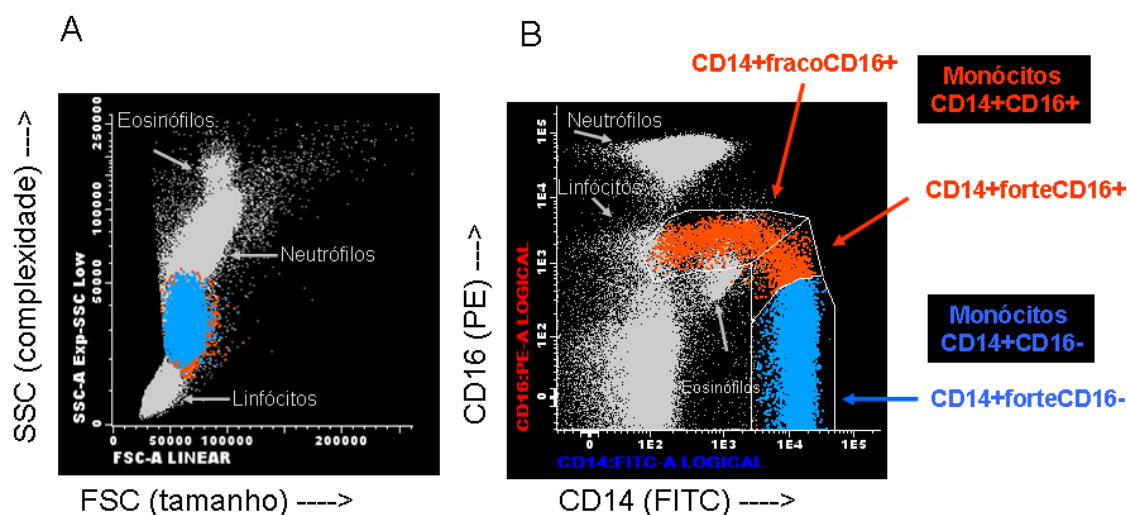


Figura 10: Subpopulações de monócitos do sangue periférico identificadas com base na expressão de CD14 e CD16. Gráfico biparamétricos de pontos (*dot-plots*), obtidos por citometria de fluxo, representando o tamanho (FSC, forward scatter) e a complexidade (SSC, side scatter) (painel A) e a intensidade de fluorescência de CD14 e de CD16 (painel B) dos monócitos CD14+CD16+ (representados a vermelho) e dos monócitos CD14+CD16- (representados a azul), assim como dos restantes leucócitos do sangue periférico (representados a cinzento).

Nos monócitos CD16+ é possível identificar duas subpopulações distintas, uma com intensidade mais fraca de expressão de CD14 e com intensidade mais forte de expressão de CD16

(CD14+fracoCD16+) e outra com intensidade mais forte de expressão de CD14 e intensidade mais fraca de expressão de CD16 (CD14+forteCD16+), esta última com características intermédias entre os monócitos CD14+fraco CD16+ e os monócitos CD14+forteCD16-.

Estas três subpopulações de monócitos parecem corresponder a estádios maturativos sequenciais (CD14+forteCD16- → CD14+forteCD16+ → CD14fraco+CD16+), com características fenotípicas e propriedades funcionais distintas (50, 57, 170).

Assim, para além de diferirem na expressão de CD14 e de CD16, as três subpopulações de monócitos acima descritas têm um perfil distinto de expressão de diversas moléculas, incluindo, moléculas de adesão e de ativação, recetores para o fragmento Fc das imunoglobulinas, recetores para quimiocinas, entre outros (50),(53, 171-176). Em particular, os “monócitos clássicos” (CD14+forteCD16-) apresentam, entre outros, níveis mais elevados de CD11b, CD32 (FcγRII), CD33, CD36 (recetor da trombospondina), CD38, CD64 (FcγRI), CD62L (selectina L), CD163 (recetor tipo *scavenger* para os complexos haptoglobina-hemoglobina) e CCR2, CXCR1 e CXCR2 enquanto os monócitos “não clássicos” (CD14+fracoCD16+) têm maior expressão de HLA-DR, CD45RA, CCR5 e CX3CR1 e expressam de forma variável MDC-8, sendo ausente ou praticamente ausente a expressão de CD36, CD64, CD62L, CD163 e CCR2; para os monócitos CD14+forteCD16+ foram descritas características fenotípicas intermédias.

No que respeita às propriedades funcionais, os monócitos CD14+fracoCD16+ são células ativadas senescentes (177) e constituem uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α, a IL-1 e a IL-12 (178). Para além de produzirem grandes quantidades de TNF em resposta ao LPS e a outros produtos de origem bacteriana, estes monócitos parecem ter também um papel importante no patrulhamento de infeções víricas, uma vez que produzem TNFα e IL-1β quando estimulados com ácidos nucleicos ou ligandos de origem vírica, via TLR7 e TLR8 (179). Produzem também maior quantidade de TNFα e IL-12, e ao mesmo tempo do óxido nítrico e da respetiva sintetase quando cultivados na presença de células tumorais (180). Demonstram ainda maior capacidade de adesão ao endotélio vascular, o que pode facilitar a sua migração para os tecidos inflamados, em resposta as quimiocinas (54, 55). Finalmente, parecem ter maior apetência para funcionarem como células apresentadoras de antígenos (181) e para se diferenciarem em células dendríticas (52). Em contrapartida, os monócitos intermédios (CD14+forteCD16+) têm maior capacidade fagocítica e menor capacidade apresentadora de antígenos do que os monócitos CD14+fracoCD16+ e, quando estimulados pelo LPS, produzem fundamentalmente IL-10 (182), uma citocina com atividade anti-inflamatória (183). De uma forma global, estes estudos mostram que os monócitos CD16+ não podem ser classificados de uma forma simplista como pró-inflamatórios, já que são células

versáteis e compreendem diferentes populações celulares com propriedades funcionais distintas (184).

Neste estudo, a percentagem de monócitos CD16+ (que inclui quer a subpopulação de monócitos “não clássicos” CD14+fracoCD16+ quer a subpopulação “intermédia” de monócitos CD14+forteCD16+) observada no grupo controle ($15.8 \pm 5.8\%$) foi superior à descrita na maioria dos estudos publicados na literatura, em que a percentagem de monócitos CD14+fracoCD16+ é, em geral, referida como sendo inferior a 10% dos monócitos do sangue periférico. No entanto, um estudo muito recente revelou uma percentagem de monócitos CD16+ no sangue periférico de indivíduos saudáveis ($30.9\% \pm 2.3\%$) superior à encontrada no nosso trabalho (185).

Parte da variabilidade observada na distribuição percentual das subpopulações de monócitos pode resultar da maior ou menor sensibilidade dos reagentes usados (por exemplo, dependendo do clone do anticorpo monoclonal anti-CD16 usado e do fluorocromo com que este é conjugado, pode ser diferente a capacidade para detetar a expressão de CD16 à superfície dos monócitos). Por outro lado, dependendo dos estudos, a subpopulação intermédia de monócitos CD14+forteCD16+ tem sido excluída, quantificada separadamente, ou considerada em conjunto com as subpopulações CD14+forteCD16- ou CD14+fracoCD16+. Outro fator a ter em conta é a origem do grupo controle, constituído no presente estudo por indivíduos adultos saudáveis dadores benévolos de sangue, já que não foi previamente avaliado se a dádiva regular de sangue interfere na distribuição das subpopulações monocitárias. Finalmente, a idade e o género são outras variáveis a ter em conta, uma vez há estudos que indicam que as mulheres têm níveis inferiores de monócitos CD16+ circulantes em relação aos homens (186) e que a fração de monócitos CD16+ aumenta com a idade (187).

- ***Doença inflamatória intestinal e monócitos CD16+***

As doenças inflamatórias intestinais (DII) – Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerosa (CU) – caracterizam-se por um estado inflamatório crónico da mucosa intestinal, cuja etiopatogenia e fisiopatologia não está ainda completamente conhecida (188), (189). Um dos aspetos mais proeminentes é a infiltração da lâmina própria do intestino por leucócitos ativados, incluindo monócitos e macrófagos, que contribuem para o desenvolvimento e perpetuação do processo inflamatório. Na fase ativa da DII há um aumento acentuado de células da linha monocítica/macrofágica na mucosa intestinal, que secretam citocinas com atividade pró-inflamatória como a interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Para além disso, estas células produzem óxido nítrico e radicais livres de oxigénio e libertam proteases que degradam a matriz extracelular. O sucesso dos anticorpos monoclonais anti-TNF alfa no tratamento

da DIIC confirma o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias na fisiopatologia da doença (190).

Foi já documentado o aumento dos monócitos CD16+ no sangue periférico em situações fisiológicas, como por exemplo em resposta ao exercício físico (191) e em várias situações patológicas de base inflamatória (50). Assim, o aumento da fração e/ou do número absoluto de monócitos CD16+ foi descrito em doentes com sépsis (192) (193), enfarte do miocárdio e doença cardíaca isquémica (194-196), acidente vascular cerebral (197), obesidade e diabetes (198), neoplasias (199), doenças víricas incluindo a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (200) e hepatite crónica causada pelo vírus da hepatite B (201), falência hepática aguda (202), insuficiência renal crónica / hemodiálise (203) e doenças inflamatórias como a artrite reumatóide (58, 204), a psoríase (205) e a DII (45, 56, 206). Em muitas destas situações, diversos autores têm considerado que os monócitos CD16+ circulantes são úteis como biomarcadores da atividade da doença e/ou de prognóstico e até como alvo terapêutico (196, 197, 201, 203, 205).

O papel dos monócitos circulantes na DII tem sido alvo de investigação desde há muitos anos, mas os dados são ainda controversos. Alguns estudos, tal como foi observado neste trabalho, reportaram níveis normais de monócitos no sangue periférico de doentes com DII, enquanto outros referiram aumento dos mesmos, sobretudo nos doentes com CU (207).

No que se refere especificamente aos monócitos CD16+, os poucos estudos realizados relataram um aumento destes monócitos no sangue periférico de pacientes com DII, principalmente nos casos de DC ativa; já no que respeita aos doentes com DC ou com CU quiescente, em geral não foram encontradas alterações (45, 56, 185, 206). Por exemplo, Grip e *col.* descreveram um aumento da fração de monócitos CD16+ em doentes com DC quando comparados com indivíduos normais (45). Da mesma forma, Hanai e *col.* encontraram uma percentagem significativamente superior de monócitos CD16+ em doentes com DC ativa, quando comparados com o grupo controle e com doentes com DC ou com CU quiescente (206). Também os estudos realizados por Koch e *col.* revelaram um aumento significativo da percentagem de monócitos CD16+ no sangue periférico de doentes com DC ativa, mas não no sangue de doentes com DC quiescente e no sangue de doentes com CU em remissão (56). Recentemente, Schwarzmaier e *col.* confirmaram que a fração de monócitos CD16+ em pacientes com DC quiescente é normal (185).

Neste estudo a percentagem e o número absoluto de monócitos nos doentes com DII não diferiram de forma significativa das observadas no grupo controle. No entanto, foi encontrado um aumento dos valores absolutos, mas não das percentagens, de monócitos CD16+ nos pacientes com DII clinicamente ativa, quando comparados com aqueles em

que estavam em remissão clínica; da mesma forma, os pacientes com CU apresentavam um aumento do número absoluto (mas não das percentagens) destes monócitos quando comparados com os pacientes com DC. O fato dos 5 pacientes com CU avaliados, mas apenas 4 dos 14 pacientes com DC, apresentarem doença clinicamente ativa, pode explicar os valores mais elevados dos números absolutos de monócitos CD16+ no primeiro caso.

Existem alguns fatores que podem explicar as diferenças encontradas entre os diversos estudos publicados. Pensa-se que a infiltração preferencial dos tecidos inflamados, nomeadamente da mucosa intestinal por monócitos CD16+ pode resultar quer de um maior recrutamento dos monócitos CD16+ circulantes em resposta a quimiocinas produzidas localmente, quer de uma diferenciação local dos monócitos CD14+forteCD16- em monócitos CD14+fracoCD16+ em resposta a citocinas e outros estímulos (56), contribuindo desta forma para a perpetuação da inflamação. A primeira hipótese aponta para a possibilidade de controlar a inflamação da mucosa intestinal atuando precocemente sobre os monócitos CD16+ circulantes, princípio este que está subjacente à utilização da leucaferese para tratamento da DIIC. De fato, a leucaferese com remoção dos monócitos CD16+ tem sido estudada e utilizada com sucesso variável no tratamento da DI, em particular na CU (206, 208, 209). Tendo em conta estes fatores, poderíamos pensar que os níveis de monócitos CD16+ no sangue periférico dependem de múltiplos fatores, incluindo o tempo de evolução da doença, a sua gravidade e fase de atividade, e a terapêutica instituída, que podem ser determinantes para uma maior ou menor grau de ativação das células do sistema imune, níveis de citocinas e quimiocinas, diferenciação destes monócitos em células dendríticas apresentadoras de antígenos e/ou migração para os tecidos inflamados.

- ***Efeitos dos fármacos anti-inflamatórios, imunomoduladores e imunossupressores sobre os monócitos CD16+***

No que respeita à ação dos fármacos imunossupressores sobre os monócitos, existem na literatura referências ao seu papel na redução dos níveis de monócitos CD16+, tendo sido sugerida a quantificação destes últimos como forma de monitorizar o tratamento (210). No entanto, os conhecimentos acerca dos efeitos dos diversos fármacos anti-inflamatórios, imunomoduladores e imunossupressores sobre os monócitos CD16+ são ainda escassos. Sabe-se, por exemplo, que os corticosteróides provocam uma depleção dos monócitos CD14+fracoCD16+ (211, 212), enquanto o efeito do tratamento com imunoglobulinas endovenosas em alta dose é controverso (213, 214); já o efeito dos diversos tipos de imunossupressores, como os análogos das tiopurinas, sobre estas células é praticamente desconhecido.

Os corticosteróides são amplamente utilizados pelo seu efeito anti-inflamatório e atuam de várias formas nas células hematológicas e no sistema imunitário (215). Entre outros, aumentam a hemoglobina e o hematócrito e a contagem de plaquetas, ao mesmo tempo que afetam os leucócitos circulantes, aumentando os neutrófilos e diminuindo os linfócitos, os eosinófilos e os basófilos, efeitos estes que dependem da dose e do tempo de administração; no que respeita aos monócitos, após a está descrita a ocorrência de monocitopenia transitória, que pode ser seguida de monocitose (216, 217). Crê-se que os efeitos dos corticóides sobre os leucócitos resultam, pelo menos em parte, de uma redistribuição das células; com desmarginalização dos neutrófilos e inibição do recrutamento dos neutrófilos e dos monócitos para os tecidos (218); por outro lado, foi demonstrado que os corticosteróides induzem a apoptose dos linfócitos, sendo este efeito mais pronunciado nos linfócitos T (219).

No presente estudo, os doentes medicados com corticosteróides estavam já em fase de “desmame” da corticoterapia, pelo que seria de esperar que as alterações acima descritas, a ocorrerem, fossem discretas. Apesar disso, constatamos a existência de contagens mais elevadas de leucócitos, neutrófilos e monócitos e plaquetas nos doentes que estavam a fazer corticoterapia, em relação àqueles que não estavam medicados com corticosteróides; já a contagem de linfócitos era idêntica nos dois grupos, apesar da diminuição da sua percentagem nos doentes medicados com corticosteróides. Finalmente, era evidente uma redução acentuada da subpopulação de monócitos CD16+ nos doentes com DIIC medicados com corticosteróides, o que está de acordo com outros estudos previamente publicados (211, 212).

Tendo em conta o desequilíbrio imunológico que ocorre na DII e o fato da azatioprina (AZA) ser um dos imunossuppressores de eleição para o tratamento dos doentes com DII, o esclarecimento do seu mecanismo de ação é importante, não só para otimizar a terapêutica, mas também para uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença. Sabe-se que a AZA dá origem a nucleotídeos tri e bifosfatados de 6-tioguanosina e a produtos metilados do seu metabolismo, que têm atividade anti-proliferativa e pró-apoptótica (220) . Por um lado, inibem a síntese das purinas, necessárias à proliferação celular; por outro, induzem a apoptose dos linfócitos T (221). No entanto, os efeitos da AZA sobre os monócitos, e em particular sobre os monócitos CD16+ são ainda desconhecidos.

Comparando os resultados antes e durante o tratamento com AZA, verificamos uma redução significativa da percentagem e do número absoluto de monócitos CD16+ nos doentes que não estavam a fazer corticoterapia quando iniciaram o tratamento com este imunossupressor. Pelo contrário, nos doentes que estavam medicados com corticosteróides quando iniciaram a AZA observamos um aumento da percentagem e do

número absoluto dos monócitos CD16+, resultante, com grande probabilidade, não de um efeito da AZA, mas sim da suspensão dos corticosteróides, que ocorreu em todos os doentes entre os dois tempos da avaliação.

CONCLUSÕES

Apesar do advento de novos fármacos e terapêuticas para a DII, os imunossuppressores convencionais, continuam a ser importantes para estes pacientes, e utilizados em grande escala. A sua utilização tem contudo algumas limitações, sobretudo no que respeita às reações adversas que podem causar, e à ausência de resposta em alguns indivíduos. Como tal, durante o tratamento com estes fármacos os pacientes devem ser vigiados e monitorizados, regularmente permitindo intervir rapidamente, reduzindo, suspendendo ou substituindo o imunossupressor, assim que justificável.

Em conclusão, os monócitos circulantes CD16+ são células potencialmente úteis como biomarcadores na DII, quer no que respeita à avaliação da atividade da doença, quer no que concerne à monitorização da terapêutica com anti-inflamatórios (corticosteróides) e imunossuppressores (nomeadamente a azatioprina).

PONTOS FORTES

Este estudo serviu-se de um grande número de doentes para caracterizar a utilização de imunossuppressores na DII, num hospital central da região norte do país.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é também o primeiro estudo em que se avalia o efeito da AZA sobre os monócitos CD16+, tendo sido encontrada uma redução da fração e do número absoluto destes monócitos nos doentes com DII tratados com este imunossupressor, na ausência de corticoterapia. Confirmamos ainda que os doentes com DII tratados com corticosteróides apresentam uma profunda depleção dos monócitos CD16+ no sangue periférico, que é reversível com a suspensão dos mesmos, ainda que, quando os doentes são tratados com AZA, não cheguem a atingir os observados nos indivíduos normais e nos doentes com DII não tratados corticosteróides. Para além disso, verificamos que os pacientes com DIIC com DCA apresentavam um número absoluto de monócitos CD16+ significativamente superior ao dos doentes com DCR e que os doentes com CU tinham um número absoluto de monócitos CD16+ superior ao do encontrado na DC; salientamos, no entanto, que é possível que esta última observação resulte do fato de todos os doentes com CU avaliados, mas apenas parte dos doentes com DC, terem DCA.

PONTOS FRACOS

Tendo em conta a natureza retrospectiva da primeira fase deste estudo, alguns parâmetros importantes não puderam ser avaliados. Destacam-se aqui os índices de atividade clínica e a cicatrização da mucosa intestinal. Este facto pode também estar na base de algumas variações encontradas, comparativamente aos dados existentes na

literatura, contudo, uma vez que existem poucos estudos que incluam a população portuguesa, uma comparação direta raramente foi possível.

No que respeita à segunda fase do estudo, uma das limitações encontradas foi o número reduzido de doentes estudados, particularmente no que se refere ao grupo de doente com CU, assim como o fato de quase metade dos pacientes terem DRC quando foram avaliados. Não tendo sido o objetivo principal, é ainda necessário considerar que a atividade da doença não foi caracterizada com recurso aos índices existentes para a monitorização das DII, mas apenas de acordo com a existência ou não de manifestações clínicas. Outras variáveis, como a duração da doença, a atividade endoscópica e a classificação de Montreal, que poderiam contribuir para uma melhor diferenciação entre grupos de pacientes com diferentes graus de atividade da doença, não foram discriminados. A estas limitações acresce a variabilidade terapêutica, decorrente de cerca de 1/4 dos doentes estarem a fazer corticosteróides quando iniciaram a AZA, embora em redução de dose com posterior suspensão; bem como do fato de alguns doentes terem feito outros tratamentos enquanto estavam medicados com o imunossupressor. Estas são as fragilidades impostas por um estudo que, apesar de prospetivo, foi assumido como sendo de natureza observacional e que, portanto, em nada interferiu com as decisões clínicas.

PERSPETIVAS FUTURAS

O conhecimento da prática clínica atual, aliado aos alicerces teóricos sobre a utilização de imunossupressores na DII, será um dado importante na optimização e monitorização do tratamento destes doentes.

Seria importante continuar a segunda fase do estudo, alargando-a a um maior número de doentes com DII (DC e CU), quer em fase de doença ativa, quer em fase de doença quiescente, tendo em consideração outros índices de atividade da doença que não exclusivamente a existência ou não de manifestações clínicas. Por outro lado, sendo a AZA um fármaco com ação retardada, cujos efeitos imunossupressores só se atingem em pleno alguns meses após o início do tratamento, é possível que avaliando um tempo posterior após atingir doses terapêuticas de AZA se obtivessem diferenças mais pronunciadas nos níveis de monócitos CD16+. Outro aspeto que importante a explorar é a quantificação diferencial dos dois subtipos de monócitos CD16 (CD14+forteCD16+ e CD14+fracoCD16+), uma vez que estes parecem ter propriedades funcionais distintas; assim como avaliar, por citometria de fluxo, a produção de diferentes tipos de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias por estas subpopulações de linfócitos, em resposta a diferentes estímulos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blumberg R. CJ, Lewis J., Wu G. Inflammatory Bowel Disease: An Update on the Fundamental Biology and Clinical Management. *Gastroenterology*. 2011;140:1701–3.
2. Thia KT LE, Sandborn WJ, Yang SK. . An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. . *Am J Gastroenterol* 2008;103(12):3167–82
3. Tsironi E FR, Probert CS, Rampton DS. . Incidence of inflammatory bowel disease is rising and abdominal tuberculosis is falling in Bangladeshis in East London, United Kingdom. . *Am J Gastroenterol* 99(9), 1749–1755 (2004)2004;99(9):1749–55 (2004).
4. Inohara C, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005;74:355-83.
5. Blonski WB, Anna M; Lichtenstein, Gary R. . Inflammatory bowel disease therapy: current state-of-the-art. *Current Opinion in Gastroenterology* 2011;27(4):346-57.
6. D'Haens G, Geboes K, Ponette E, Penninckx F, Rutgeerts P. Healing of severe recurrent ileitis with azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1997;112(5):1475-81.
7. Sandborn WJ, Hanauer SB. Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(12):2962-72.
8. Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, et al. Methotrexate for the Treatment of Crohn's Disease. *New England Journal of Medicine*. 1995;332(5):292-7.
9. Feagan BG, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, et al. A Comparison of Methotrexate with Placebo for the Maintenance of Remission in Crohn's Disease. North American Crohn's Study Group Investigators. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(22):1627-32.
10. Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, et al. Cyclosporine in Severe Ulcerative Colitis Refractory to Steroid Therapy. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(26):1841-5.
11. Zhu M, Xu X, Nie F, Tong J, Xiao S, Ran Z. The efficacy and safety of selective leukocytapheresis in the treatment of ulcerative colitis: a meta-analysis. *International journal of colorectal disease*. 2011;26(8):999-1007. Epub 2011/04/09.
12. Vernia P, D'Ovidio V, Meo D. Leukocytapheresis in the treatment of inflammatory bowel disease: Current position and perspectives. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2010;43(2):227-9. Epub 2010/09/08.
13. Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute Technical Review on Corticosteroids, Immunomodulators, and Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2006;130(3):940-87.
14. Chadwick Williams RP, Subrata Ghosh, Kevin Rioux. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Ther Adv Gastroenterol*. 2011;4(4):237-48.
15. Gasche C SJ, Brynskov J, et al. . A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. . *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:8-15.
16. J Satsangi MSS, S Vermeire, J-F Colombel. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55:749-53.

17. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17. Epub 2004/05/29.
18. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ. Management of Crohn's Disease in Adults. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(2):465-83.
19. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1518-32.
20. Lichtenstein GR, YS, Bala M et al. . Remission in patients with Crohn's disease is associated with improvement in employment and quality of life and a decrease in hospitalizations and surgeries *Am J Gastroenterol* 2004;99:91-6
21. Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(6):417-29.
22. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998;115(1):182-205.
23. Farmer RG, WG, Fazio VW Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology*. 1985;88:1818 – 25.
24. Sachar DB, AH, Farmer RG, et al. Proposed Classification of Patient Subgroups in Crohn's Disease. *Gastroenterol Int*. 1992;5:141-54.
25. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, El Yafi FAN, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*. 2001;49(6):777-82.
26. Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & hepatology*. 2011;7(4):235-41. Epub 2011/08/23.
27. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(18):1713-25.
28. Cottone M, Scimeca D, Mocciaro F, Civitavecchia G, Perricone G, Orlando A. Clinical course of ulcerative colitis. *Digestive and Liver Disease*. 2008;40, Supplement 2(0):S247-S52.
29. Sicilia B, VR, Gomollo'n F, et al. Ulcerative pancolitis predicts the need for colectomy: study of an incident cohort of patients with ulcerative colitis in Arago'n (Spain). *Gastroenterol Hepatol*. 2005;28:55–9.
30. Triantafillidis J, EA, Barbatzas C, et al. Ulcerative colitis in Greece: clinicoepidemiological data, course and prognostic factors in 413 consecutive patients. *J Clin Gastroenterol*. 1998;27:204 -10.
31. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*. 2006;55(suppl 1):i1-i15.
32. Mendoza JL, TC, Lana R, Alba C, Izquierdo S, Díaz-Rubio M. Manifestaciones extraintestinales de la enfermedad inflamatoria intestinal: diferencias entre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:297-300.
33. Sartor RB. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3(7):390-407.
34. Hugot J-P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard J-P, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603.

35. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603-6.
36. Lesage S ZH, Cezard J, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845-57.
37. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJP, Mascheretti S, et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *The Lancet*. 2002;359(9318):1661-5.
38. Ho G-T, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, et al. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2005;128(2):288-96.
39. Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Cherikuri A, O'Toole D, et al. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology*. 2000;118(2):279-88.
40. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A Novel Model of Inflammatory Bowel Disease: Mice Deficient for the Multiple Drug Resistance Gene, *mdr1a*, Spontaneously Develop Colitis. *The Journal of Immunology*. 1998;161(10):5733-44.
41. Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, et al. Recent understanding of IBD pathogenesis: Implications for future therapies. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006;12(11):1068-83.
42. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews*. 2005;206(1):260-76.
43. YR. M. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. . 2000;6:21-3
44. Selby WS, Janossy, G., Bofill, M., Jewell, D.P. Intestinal lymphocyte subpopulations in inflammatory bowel disease: an analysis by immunohistological and cell isolation techniques. . *Gut*. 1984;25:32-40
45. Grip O, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G. Increased subpopulations of CD16+ and CD56+ blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13(5):566-72.
46. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock H. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74(7):2527-34.
47. Gordon S TP. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953-64.
48. Ziegler-Heitbrock H, Strobel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, et al. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations *Blood*. 1992;79(2):503-11.
49. Ziegler-HeitBrock HWL, Passlick, B., Flieger, D. . The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma*. 1988;7:521-7.
50. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81(3):584-92.
51. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H-D, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+ /CD16+ blood monocytes. *European Journal of Immunology*. 2001;31(1):48-56.

52. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. The CD16+ (FcγRIII+) Subset of Human Monocytes Preferentially Becomes Migratory Dendritic Cells in a Model Tissue Setting. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;196(4):517-27.
53. Weber C, Belge K. U., von Hundelshausen P., Draude G., Steppich B., Mack M., Frankenberger M., Weber K. S. C., Ziegler-Heitbrock H. W. L. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000;67:699-704.
54. Ancuta P, Rao R., Moses A., Mehle A., Shaw S. K., Luscinskas F. W., Gabudza D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med*. 2003;197:1701-7.
55. Ancuta P, Moses A., Gabudza D. Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology*. 2004;209:11-20.
56. Koch S, Kucharzik T, Heidemann J, Nusrat A, Luegering A. Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;161(2):332-41.
57. Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European Journal of Immunology*. 1993;23(9):2053-8.
58. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, et al. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;46(10):2578-86.
59. Takeda S-i, Sato T, Katsuno T, Nakagawa T, Noguchi Y, Yokosuka O, et al. Adsorptive Depletion of α4 Integrinhi- and CX3CR1hi-Expressing Proinflammatory Monocytes in Patients with Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2010;55(7):1886-95.
60. Sartor RB. Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther*. 1997;11 Suppl 3:17-22; discussion -3. Epub 1998/02/19.
61. Guarner F, Casellas F, Borruel N, Antolin M, Videla S, Vilaseca J, et al. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases. *European journal of clinical nutrition*. 2002;56 Suppl 4:S34-8. Epub 2003/01/31.
62. Gionchetti P, Rizzello F, Lammers KM, Morselli C, Sollazzi L, Davies S, et al. Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(21):3306-13. Epub 2006/05/31.
63. Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, et al. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut*. 1991;32(9):1071-5. Epub 1991/09/01.
64. Colombel JF, Lemann M, Cassagnou M, Bouhnik Y, Duclos B, Dupas JL, et al. A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. *Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID)*. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(3):674-8. Epub 1999/03/23.
65. Arnold GL BM, Pryjdun VO, Mook WJ. . Preliminary study of ciprofl oxacin in active Crohn's disease. . *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:10-5.
66. A. Dignass GVA, J.O. Lindsay, M. Lémann, J. Söderholm, J.F. Colombel, S. Danese, A. D'Hoore, M. Gassull, F. Gomollón, D.W. Hommes,, P. Michetti COM, T. Öresland, A. Windsor, E.F. Stange, S.P.L. Travis The second European evidence-based

consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* 2010;4:28-62.

67. Chapman RW SW, Jewell DP. . Controlled trial of intravenous metronidazole as an adjunct to corticosteroids in severe ulcerative colitis. . *Gut*. 1986;27:1210-121
68. Williams C, Panaccione, R., Ghosh, S., Rioux, K. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Ther Adv Gastroenterol*. 2011;4:237-48.
69. Iacucci M, de Silva S, Ghosh S. Mesalazine in inflammatory bowel disease: a trendy topic once again? *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2010;24(2):127-33. Epub 2010/02/13.
70. Bergman R, Parkes M. Systematic review: the use of mesalazine in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006;23(7):841-55.
71. Langholz E, Munkholm, P., Nielsen, O.H., Kreiner, S., Binder, V. . Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Copenhagen county from 1962 to 1987. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:1247-56.
72. Triantafillidis JK, Merikas, E., Georgopoulos, F.,. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Design, Development and Therapy* 2011;5:185–210
73. Ito K CK, Adcock IM. . Update on glucocorticoid action and resistance. . *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:522–43.
74. Regueiro M LJE, Steinhart AH, Cohen RD. . Medical management of left-sided ulcerative colitis and ulcerative proctitis: critical evaluation of therapeutic trials. . *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:979-94.
75. Kane SV, Schoenfeld P, Sandborn WJ, Tremaine W, Hofer T, Feagan BG. Systematic review: the effectiveness of budesonide therapy for Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2002;16(8):1509-17.
76. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1992;43(4):329-39.
77. Sandborn WJ. State-of-the-Art: Immunosuppression and Biologic Therapy. *Dig Dis*. 2010;28:536-42.
78. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE, Dickson M, Balkwill AM. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *The Lancet*. 1994;343(8908):1249-52.
79. Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the Management of Inflammatory Bowel Disease: Short- and Long-Term Toxicity. *Annals of Internal Medicine*. 1989;111(8):641-9.
80. WJ S. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine, and methotrexate. *Am J Gastroenterol* 1996;91:423–33.
81. Haber CJ MS, Present DH, Korelitz BI. Nature and course of pancreatitis caused by 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1986;91:982– 6
82. Korelitz BI, Zlatanich J, Goel F, Fuller S. Allergic Reactions to 6-Mercaptopurine During Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 1999;28(4):341-4.
83. Cheng B LG. Are individuals with Crohn's disease who are intolerant to 6-mercaptopurine able to tolerate azathioprine? . *Gastroenterology* 2000;118:A1336.

84. Boulton-Jones JR, Pritchard K, Mahmoud AA. The use of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease after failure of azathioprine therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2000;14(12):1561-5.
85. George J PD, Pou R, Bodian C, Rubin PH. . The long-term outcome of ulcerative colitis treated with 6-mercaptopurine. . *Am J Gastroenterol* 1996;91:1711-4
86. Pfau P, Kochman ML, Furth EE, Lichtenstein GR. Cytomegalovirus colitis complicating ulcerative colitis in the steroid-naive patient. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(3):895-9.
87. Silman AJ, Petrie J, Hazleman B, Evans SJ. Lymphoproliferative cancer and other malignancy in patients with rheumatoid arthritis treated with azathioprine: a 20 year follow up study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1988;47(12):988-92.
88. Kinlen LJ. Incidence of cancer in rheumatoid arthritis and other disorders after immunosuppressive treatment. *The American journal of medicine*. 1985;78(1):44-9.
89. Asten P BJ, Symmons D. . Risk of developing certain malignancies is related to duration of immunosuppressive drug exposure in patients with rheumatic diseases. . *J Rheumatol* 1999;26:1705-14
90. Lewis JD, Bilker WB, Brensinger C, Deren JJ, Vaughn DJ, Strom BL. Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma. *Gastroenterology*. 2001;121(5):1080-7.
91. Farrell RJ, Ang Y, Kileen P, O'Briain DS, Kelleher D, Keeling PWN, et al. Increased incidence of non-Hodgkin's lymphoma in inflammatory bowel disease patients on immunosuppressive therapy but overall risk is low. *Gut*. 2000;47(4):514-9.
92. Fraser AG, Orchard TR, Robinson EM, Jewell DP. Long-term risk of malignancy after treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2002;16(7):1225-32.
93. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-Mercaptopurine in Crohn Disease. *Annals of Internal Medicine*. 1995;123(2):132-42.
94. Pearson DC MG, Fick G, Sutherland LR. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease (Cochrane Review). *The Cochrane Library*. 2002.
95. Myreliid P, Svärm S, Andersson P, Almer S, Bodemar G, Olaison G. Azathioprine as a postoperative prophylaxis reduces symptoms in aggressive Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2006;41(10):1190-5.
96. Egan LJ SW. Methotrexate for inflammatory bowel disease: pharmacology and preliminary results. . *Mayo Clin Proc* 1996;71:69-80.
97. CUTOLO M, SULLI A, PIZZORNI C, SERIOLO B, STRAUB RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2001;60(8):729-35.
98. Seitz M. Molecular and cellular effects of methotrexate. *Current Opinion in Rheumatology*. 1999;11(3):226.
99. Oren R AN, Odes S, et al. . Methotrexate in chronic active ulcerative colitis: a double-blind, randomized, Israeli multicenter trial. . *Gastroenterology* 1996;110:1416-21.
100. Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, et al. Methotrexate for the Treatment of Crohn's Disease. *The North American Crohn's Study Group Investigators*. *New England Journal of Medicine*. 1995;332:292-7.
101. Alfadhli AA MJ, Feagan BG. . Methotrexate for induction of remission in refractory Crohn's disease (Cochrane Review). . *Cochrane Database Syst Rev* 2003(1):CD003459.

102. Anand B, Pithadia SJ. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological Reports*. 2011;63:629-42.
103. Siegel CA, Sands BE. Review article: practical management of inflammatory bowel disease patients taking immunomodulators. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2005;22(1):1-16.
104. M. WAHED JRL-A, L. M. BAXTE, J. K. LIMDI, S. A. MCCARTNEY, J. O. LINDSAY SLB. Efficacy of methotrexate in Crohn's disease and ulcerative colitis patients unresponsive or intolerant to azathioprine /mercaptopurine. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30:614-20.
105. Baker K JD. Cyclosporin for the treatment of severe inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1989;3:143-9
106. Hutchinson IV, Bagnall W, Bryce P, Pufong B, Geraghty P, Brogan I. Differences in the Mode of Action of Cyclosporine and FK 506. *Transplantation Proceedings*. 1998;30(4):959-60.
107. Van Assche G, D'haens G, Noman M, Vermeire S, Hiele M, Asnong K, et al. Randomized, double-blind comparison of 4 mg/kg versus 2 mg/kg intravenous cyclosporine in severe ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1025-31.
108. Moskovitz DN, Van Assche G, Maenhout B, Arts J, Ferrante M, Vermeire S, et al. Incidence of Colectomy During Long-term Follow-up After Cyclosporine-Induced Remission of Severe Ulcerative Colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2006;4(6):760-5.
109. Cohen RD, Stein R, Hanauer SB. Intravenous cyclosporin in ulcerative colitis: a five-year experience. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(6):1587-92.
110. Kornbluth A PD, Lichtiger S, Hanauer S. . Cyclosporin for severe ulcerative colitis: a user's guide. . *Am J Gastroenterol* 1997;92:1424-8
111. Arts J DHG, Zeegers M, et al. Long-term outcome of treatment with intravenous cyclosporin in patients with severe ulcerative colitis. . *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:73-8.
112. Loftus CG, Loftus EV, Sandborn WJ. Cyclosporin for refractory ulcerative colitis. *Gut*. 2003;52(2):172-3.
113. Doménech E G-PE, Bernal I, Rosinach M, Cabré E, Fluvía L, et al. . Azathioprine without oral ciclosporina in the long term maintenance of remission induced by intravenous ciclosporine in severe, steroidrefractory ulcerative colitis . . *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:2061-5
114. Hart AL, Ng SC. Review article: the optimal medical management of acute severe ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2010;32(5):615-27.
115. Pikarsky A, Zmora O, Wexner SD. Immunosuppressants and operation in ulcerative colitis. *Journal of the American College of Surgeons*. 2002;195(2):251-60.
116. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *The Lancet*. 2002;359(9317):1541-9.
117. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1383-95. Epub 2010/04/16.
118. S.P.L. Travis EFS, M. Lémann, T. Øresland, W.A. Bemelman, Y. Chowers, J.F. Colombel, G. D'Haens, S. Ghosh, P. Marteau, W. Kruis, N.J.McC. Mortensen, F. Penninckx, M. Gassull. European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* 2008;2:24-62

119. Lawson MM TA, Akobeng AK. . Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;3:CD005112.
120. Luger N KT, Stoll R, et al. Current concept of the role of monocytes/macrophages in inflammatory bowel disease - balance of proinflammatory and immunosuppressive mediators. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30:338-44.
121. Tibble JA SG, Bridger DS, et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. . *Gastroenterology*. 2000;119:15-22.
122. Kempe K TH, Yang K, et al. Filtration leukocytapheresis therapy in the treatment of rheumatoid arthritis patients resistant to or failed with methotrexate. . *Ther Apher Dial* 2004;8:197-205
123. Kanekura T YN, Yonezawa T, et al. . Treatment of pustular psoriasis with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *J. J Am Acad Dermatol* 2003;49:329-32.
124. Saniabadi AR HH, Takeuchi K, et al. . Adacolumn, an adsorptive carrier based granulocyte and monocyte apheresis device for the treatment of inflammatory and refractory diseases associated with leukocytes. . *Ther Apher Dial*. 2003;7:48-59.
125. Sawada K OK, Kosaka T, et al. . Leukocytapheresis with leukocyte removal filter as a new therapy for ulcerative colitis. *Ther Apher* 1997;1:207-11.
126. Ohara M SA, Kokuma S, et al. . Granulocytapheresis in the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Artif Organs* 1997;2:989-94
127. Sawada K MT, Shimoyama T, et al. Multicenter randomized controlled trial for the treatment of ulcerative colitis with a leukocytapheresis column. . *Curr Pharm Des*. 2003;9:307-21
128. Kohgo Y AT, Maemoto A, et al. . Leukocytapheresis for treatment of IBD. . *J Gastroenterol* 2003;38:51-4.
129. Lewis RT, Maron DJ. Efficacy and complications of surgery for Crohn's disease. *Gastroenterology & hepatology*. 2010;6(9):587-96. Epub 2010/11/23.
130. Lautenbach* E, Berlin‡ JA, Lichtenstein§ GR. Risk factors for early postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998;115(2):259-67.
131. Yamamoto T BI, Connolly AB, et al. . Outcome of strictureplasty for duodenal Crohn's disease. *Br J Surg* 1999;86:259-62.
132. Nugent FW RM. Duodenal Crohn's disease: An analysis of 89 cases. . *Am J Gastroenterol* 1989;84:249-54.
133. Hancock L WA, Mortensen NJ. . Inflammatory bowel disease: the view of the surgeon. . *Colorectal disease* 2006;8:10-4.
134. Jawahri A KM, Ong C, et al. . Intra-abdominal and pelvic abscess in Crohn's disease: results of noninvasive and surgical managment. *Br J Surg* 1998;85:367-71.
135. Winslet MC AH, Allan RH, et al. . Fecal diversion in the management of Crohn's disease of the colon. . *Dis Colon Rectum*. 1993;36:757-62.
136. C. GJ. Surgical treatment of Crohn's disease affecting mainly or entirely the large bowel. *World J Surg* 1988;12:186-90.
137. Longo WE BG, Cahow CE. . Treatment of Crohn's colitis. Segmental or total colectomy? *Arch Surg*. 1988;123:588-90
138. Singh B, George BD, McC Mortensen NJ. Surgical therapy of perianal Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*. 2007;39(10):988-92.

139. Meier J, Sturm, A. Current treatment of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2011;17(27):3204-12
140. Andersson P SJ. Surgery in ulcerative colitis: indication and timing. . *Dig Dis*. 2009;27:335-40
141. Lennard-Jones JE SS. Clinical uniformity of Inflammatory bowel disease a presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9(353-359).
142. Farmer RG HW, Turnbull RB Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: A statistical study of 165 cases. *Gastroenterol*. 1975;88:627-35.
143. Punati J, Markowitz J, Lerer T, Hyams J, Kugathasan S, Griffiths A, et al. Effect of early immunomodulator use in moderate to severe pediatric Crohn disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(7):949-54. Epub 2008/02/29.
144. Holtmann MH, Krummenauer F, Claas C, Kremeyer K, Lorenz D, Rainer O, et al. Long-term effectiveness of azathioprine in IBD beyond 4 years: a European multicenter study in 1176 patients. *Dig Dis Sci*. 2006;51(9):1516-24. Epub 2006/08/24.
145. Prefontaine E, Macdonald JK, Sutherland LR. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009(4):CD000545. Epub 2009/10/13.
146. Prefontaine E, Sutherland LR, Macdonald JK, Cepoiu M. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009(1):CD000067. Epub 2009/01/23.
147. Gisbert JP, Linares PM, McNicholl AG, Mate J, Gomollon F. Meta-analysis: the efficacy of azathioprine and mercaptopurine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(2):126-37. Epub 2009/04/28.
148. Alfadhli AA, McDonald JW, Feagan BG. Methotrexate for induction of remission in refractory Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003(1):CD003459. Epub 2003/01/22.
149. Lemann M, Mary JY, Duclos B, Veyrac M, Dupas JL, Delchier JC, et al. Infliximab plus azathioprine for steroid-dependent Crohn's disease patients: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1054-61. Epub 2006/04/19.
150. R. Panaccione SG, S. Middleton, J.R.M. Velazquez, I. Khalif, L. Flint, H.J. van Hoogstraten, H. Zheng, S. Danese, P. Rutgeerts. Infliximab, azathioprine, or infliximab + azathioprine for treatment of moderate to severe ulcerative colitis: The UC SUCCESS trial. Apresentação oral dos resultados no congresso da ECCO 2012. 2012.
151. Khan KJ, Dubinsky MC, Ford AC, Ullman TA, Talley NJ, Moayyedi P. Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(4):630-42. Epub 2011/03/17.
152. Lakatos PL, Czegledi Z, Szamosi T, Banai J, David G, Zsigmond F, et al. Perianal disease, small bowel disease, smoking, prior steroid or early azathioprine/biological therapy are predictors of disease behavior change in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2009;15(28):3504-10.
153. Tarrant KM, Barclay ML, Frampton CM, Gearry RB. Perianal disease predicts changes in Crohn's disease phenotype-results of a population-based study of inflammatory bowel disease phenotype. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(12):3082-93. Epub 2008/12/18.
154. Romberg-Camps MJ, Dagnelie PC, Kester AD, Hesselink-van de Kruijs MA, Cilissen M, Engels LG, et al. Influence of phenotype at diagnosis and of other potential

prognostic factors on the course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(2):371-83. Epub 2009/01/29.

155. Samuel S, Ingle SB, Dhillon S, Yadav S, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. Cumulative Incidence and Risk Factors for Hospitalization and Surgery in a Population-based Cohort of Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2013. Epub 2013/05/11.

156. Choquet A, Yamamoto-Furusho JK, Reyes E, Takahashi-Monroy T, Vargas-Vorackova F, Uscanga L. [Predictors of colectomy in patients with ulcerative colitis. A cohort analysis of 184 cases]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2004;56(1):11-5. Epub 2004/05/18. Predictores de colectomia en enfermos con colitis ulcerativa cronica inespecifica (CUCI). Analisis de una cohorte de 184 casos.

157. Markowitz* J, Grancher* K, Kohn‡ N, Lesser‡ M, Daum* F. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2000;119(4):895-902.

158. Hausmann J, Zabel K, Herrmann E, Schroder O. Methotrexate for maintenance of remission in chronic active Crohn's disease: long-term single-center experience and meta-analysis of observational studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(7):1195-202. Epub 2009/11/20.

159. Maksymowych WP, Inman RD, Gladman D, Thomson G, Stone M, Karsh J, et al. Canadian Rheumatology Association Consensus on the use of anti-tumor necrosis factor-alpha directed therapies in the treatment of spondyloarthritis. *J Rheumatol*. 2003;30(6):1356-63. Epub 2003/06/05.

160. Van Assche G, Dignass A, Reinisch W, van der Woude CJ, Sturm A, De Vos M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *Journal of Crohn's & colitis*. 2010;4(1):63-101. Epub 2010/12/03.

161. Leite S, Ribeiro JM, Lima SC, Barroso S, Cotter J. [Azathioprine in inflammatory bowel disease]. *Acta medica portuguesa*. 2009;22(1):33-40. Epub 2009/04/04. Azatioprina na doenca inflamatoria intestinal.

162. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut*. 2002;50(4):485-9. Epub 2002/03/13.

163. Bar F, Sina C, Fellermann K. Thiopurines in inflammatory bowel disease revisited. *World J Gastroenterol*. 2013;19(11):1699-706. Epub 2013/04/05.

164. de Jong DJ, Goullet M, Naber TH. Side effects of azathioprine in patients with Crohn's disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2004;16(2):207-12.

165. Saibeni S, Virgilio T, D'Inca R, Spina L, Bortoli A, Paccagnella M, et al. The use of thiopurines for the treatment of inflammatory bowel diseases in clinical practice. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2008;40(10):814-20. Epub 2008/05/16.

166. Absah I, Faubion WA, Jr. Concomitant therapy with methotrexate and anti-TNF-alpha in pediatric patients with refractory crohn's colitis: a case series. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(8):1488-92. Epub 2011/09/02.

167. Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunology today*. 1996;17(9):424-8. Epub 1996/09/01.

168. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80. Epub 2010/07/16.
169. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Frontiers in immunology*. 2013;4:23. Epub 2013/02/06.
170. Ancuta P, Liu KY, Misra V, Wacleche VS, Gosselin A, Zhou X, et al. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC genomics*. 2009;10:403. Epub 2009/08/29.
171. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, et al. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(12):1437-47. Epub 1996/12/01.
172. Tanaka M, Honda J, Imamura Y, Shiraishi K, Tanaka K, Oizumi K. Surface phenotype analysis of CD16+ monocytes from leukapheresis collections for peripheral blood progenitors. *Clinical and Experimental Immunology*. 1999;116(1):57-61. Epub 1999/04/21.
173. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*. 2000;67(1):97-103. Epub 2000/01/27.
174. Siedlar M, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock LH, Belge KU. The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14+ CD16+ monocytes. *Immunobiology*. 2000;202(1):11-7. Epub 2000/07/06.
175. Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2001;100(3):325-38. Epub 2001/08/22.
176. Tallone T, Turconi G, Soldati G, Pedrazzini G, Moccetti T, Vassalli G. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *Journal of cardiovascular translational research*. 2011;4(2):211-9. Epub 2011/02/11.
177. Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R, Carracedo J. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(3):1809-15. Epub 2010/12/31.
178. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(7):3536-42. Epub 2002/03/22.
179. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010;33(3):375-86. Epub 2010/09/14.
180. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, et al. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Experimental hematology*. 2004;32(8):748-55. Epub 2004/08/17.
181. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Current opinion in immunology*. 2008;20(1):52-60. Epub 2007/12/28.

182. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian journal of immunology*. 2008;67(2):152-9. Epub 2008/01/19.
183. de Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Annals of medicine*. 1995;27(5):537-41. Epub 1995/10/01.
184. van de Veerdonk FL, Netea MG. Diversity: a hallmark of monocyte society. *Immunity*. 2010;33(3):289-91. Epub 2010/09/28.
185. Schwarzmaier D, Foell D, Weinhage T, Varga G, Dabritz J. Peripheral monocyte functions and activation in patients with quiescent Crohn's disease. *PloS one*. 2013;8(4):e62761. Epub 2013/05/10.
186. Heimbeck I, Hofer TP, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marei A, et al. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010;77(9):823-30. Epub 2010/07/28.
187. Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC immunology*. 2010;11:30. Epub 2010/06/23.
188. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009;361(21):2066-78. Epub 2009/11/20.
189. Danese S. Immune and nonimmune components orchestrate the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2011;300(5):G716-22. Epub 2011/01/15.
190. Denmark VK, Mayer L. Current status of monoclonal antibody therapy for the treatment of inflammatory bowel disease: an update. *Expert review of clinical immunology*. 2013;9(1):77-92. Epub 2012/12/22.
191. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HW. Selective mobilization of CD14⁽⁺⁾CD16⁽⁺⁾ monocytes by exercise. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;279(3):C578-86. Epub 2000/08/16.
192. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 1993;82(10):3170-6. Epub 1993/11/15.
193. Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. CD14⁺CD16⁺ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scandinavian journal of immunology*. 2002;55(6):629-38. Epub 2002/05/25.
194. Shantsila E, Lip GY. Monocyte diversity in myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(2):139-42. Epub 2009/07/04.
195. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121(22):2437-45. Epub 2010/06/10.
196. Ozaki Y, Imanishi T, Taruya A, Aoki H, Masuno T, Shiono Y, et al. Circulating CD14⁺CD16⁺ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2012;76(10):2412-8. Epub 2012/07/13.
197. Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;106(5):757-62. Epub 2011/09/09.
198. Poitou C, Dalmás E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdenmour M, et al. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss:

- relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(10):2322-30. Epub 2011/07/30.
199. Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, et al. CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1995;85(10):2910-7. Epub 1995/05/15.
200. Ansari AW, Meyer-Olson D, Schmidt RE. Selective expansion of pro-inflammatory chemokine CCL2-loaded CD14+CD16+ monocytes subset in HIV-infected therapy naive individuals. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(1):302-6. Epub 2012/09/11.
201. Zhang JY, Zou ZS, Huang A, Zhang Z, Fu JL, Xu XS, et al. Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *PloS one*. 2011;6(3):e17484. Epub 2011/03/11.
202. Abeles RD, McPhail MJ, Sowter D, Antoniadou CG, Vergis N, Vijay GK, et al. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2012;81(10):823-34. Epub 2012/07/28.
203. Scherberich JE. Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2003;41(10):459-64. Epub 2004/01/06.
204. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(3):671-7. Epub 2011/10/19.
205. Fujisawa T, Murase K, Kanoh H, Takemura M, Ohnishi H, Seishima M. Adsorptive depletion of CD14(+)CD16(+) proinflammatory monocyte phenotype in patients with generalized pustular psoriasis: clinical efficacy and effects on cytokines. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*. 2012;16(5):436-44. Epub 2012/10/11.
206. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Yamada M, Kikuyama M, et al. Adsorptive depletion of elevated proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(5):1210-6. Epub 2008/01/08.
207. Mee AS, Berney J, Jewell DP. Monocytes in inflammatory bowel disease: absolute monocyte counts. *Journal of clinical pathology*. 1980;33(10):917-20. Epub 1980/10/01.
208. Kanai T, Makita S, Kawamura T, Nemoto Y, Kubota D, Nagayama K, et al. Extracorporeal elimination of TNF-alpha-producing CD14(dull)CD16(+) monocytes in leukocytapheresis therapy for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(3):284-90. Epub 2007/01/09.
209. Hanai H. Positions of selective leukocytapheresis in the medical therapy of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(47):7568-77. Epub 2006/12/16.
210. Scherberich JE, Nockher WA. CD14++ monocytes, CD14+/CD16+ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 1999;37(3):209-13. Epub 1999/06/03.

211. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HWL. Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clinical and Experimental Immunology*. 1998;112(3):501-6.
212. Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *J Leukoc Biol*. 2003;74(1):33-9. Epub 2003/07/02.
213. Siedlar M, Strach M, Bukowska-Strakova K, Lenart M, Szaflarska A, Weglarczyk K, et al. Preparations of intravenous immunoglobulins diminish the number and proinflammatory response of CD14+CD16++ monocytes in common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2011;139(2):122-32. Epub 2011/02/09.
214. Tjon AS, Metselaar HJ, te Boekhorst PA, van Hagen PM, Kwekkeboom J. High-dose intravenous immunoglobulin does not reduce the numbers of circulating CD14(+)CD16(++) monocytes in patients with inflammatory disorders. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2012;145(1):11-2. Epub 2012/08/14.
215. McKay LJ CJ. Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids. . *Holl-Frei Cancer Med [Internet]* 6th edition, Hamilton (ON): BC Decker Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al, 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13780/>
216. Pountain GD, Keogan MT, Hazleman BL, Brown DL. Effects of single dose compared with three days' prednisolone treatment of healthy volunteers: contrasting effects on circulating lymphocyte subsets. *Journal of clinical pathology*. 1993;46(12):1089-92. Epub 1993/12/01.
217. Shoenfeld Y, Gurewich Y, Gallant LA, Pinkhas J. Prednisone-induced leukocytosis. Influence of dosage, method and duration of administration on the degree of leukocytosis. *Am J Med*. 1981;71(5):773-8. Epub 1981/11/01.
218. Balow JE, Rosenthal AS. Glucocorticoid suppression of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*. 1973;137(4):1031-41. Epub 1973/04/01.
219. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells. *International archives of allergy and immunology*. 1994;105(4):347-54. Epub 1994/12/01.
220. Cara CJ, Pena AS, Sans M, Rodrigo L, Guerrero-Esteo M, Hinojosa J, et al. Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2004;10(11):RA247-54. Epub 2004/10/28.
221. Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut*. 2007;56(2):293-303. Epub 2006/09/08.